



UNIVERSITÀ DI PISA

**Scuola di Ingegneria
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica**

**Indirect Rapid Prototyping
per la ricostruzione e la rigenerazione dell'osso
mandibolare**

Relatori:

Prof. Ing. Giovanni Vozzi
Ing. Carmelo De Maria

Candidato:

Anna Vivarelli

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

Introduzione	1
1 <u>Difetti ossei a livello Maxillo-Facciale: Problemi e Soluzioni</u>	4
1.1 Rigenrazione ossea in implantologia dentale	4
1.1.1 Le membrane	5
1.1.2 Materiali da Innesto	6
1.1.3 Procedura chirurgica	8
1.2 Chirurgia Maxillo-facciale: ricostruzione mandibolare	8
1.2.1 Tecniche classiche di ricostruzione mandibolare	9
1.2.2 Avvento delle tecnologie CAD/CAM in ricostruzione mandibolare	11
1.3 Ingegneria tessutale per il tessuto osseo	11
1.3.1 Cenni sul tessuto osseo	12
1.3.2 Biomateriali	13
1.3.3 Scaffold: proprietà e metodi di fabbricazione	15
1.3.4 Fattori di crescita	17
1.4 Scopo della tesi	17
Bibliografia	19
2 <u>La prototipazione rapida</u>	21
2.1 Introduzione	21
2.2 Fasi del ciclo di Prototipazione Rapida	22
2.2.1 Modellazione tridimensionale ed esportazione in un formato di interscambio	23
2.2.2 Da CAD a CAM	24
2.2.3 Post trattamenti	25
2.3 Classificazione delle tecnologie di Prototipazione Rapida	25

2.3.1	Solidificazione di un materiale liquido	26
2.3.2	Generazione dalla fase solida	27
2.3.3	Generazione da polveri	31
2.3.4	Caratteristiche delle tecnologie RP	33
2.4	Prototipazione rapida indiretta	34
2.5	Prototipazione Rapida in Medicina	37
2.5.1	Procedure e Software per la prototipazione rapida in ambito chirurgico	39
2.5.2	Software per la segmentazione	41
2.5.3	Ricostruzione di difetti ossei maxillo-facciali	45
	Bibliografia	49
3	<u>Design dello stampo</u>	54
3.1	Fasi di lavoro	54
3.2	Segmentazione della mandibola	54
3.2.1	Operazioni di Finitura	59
3.3	Identificazione del difetto	61
3.3.1	Specchio	63
3.3.2	Allineamento	64
3.3.3	Sottrazione	65
3.3.4	Finiture	65
3.4	Creazione dello stampo	65
3.5	Pipeline MaDeRe	67
3.6	Applicazione al caso clinico	68
	Bibliografia	74

4	<u>Studi di fabbricazione</u>	75
4.1	Sostituto osseo: composizione, caratteristiche e sintesi	75
4.1.1	Gelatina	75
4.1.2	Idrossiapatite	76
4.1.3	Genipina	76
4.1.4	Reazione genipina e gelatina	78
4.1.5	Caratterizzazione degli scaffold in gelatina e idrossiapatite	79
4.1.6	Protocollo utilizzato	80
4.2	Strumentazione utilizzata	81
4.2.1	Stampante 3D e materiali	81
4.2.2	Forno	83
4.2.3	Forno ad UV	83
4.2.4	Liofilizzatore	84
4.3	Realizzazione dello stampo	85
4.3.1	Versione 1.0	85
4.3.2	Modifiche alla versione 1.0	86
4.3.3	Versione 2.0	91
4.3.4	Modifiche alla versione 2.0	92
4.3.5	Versione 3.0	93
	Bibliografia	96
	Conclusioni	98
	APPENDICE: Codice delle funzioni implementate in C++	102

Introduzione

Nell'implantologia dentale è spesso necessario ricostruire difetti ossei a livello mandibolare: le diminuzioni di volume dei processi alveolari rendono infatti impossibile l'inserimento di impianti dentali. La correzione delle atrofie ossee viene effettuata principalmente con la rigenerazione ossea guidata [1], operazione affidata esclusivamente all'abilità del dentista, che, una volta aperta la gengiva, deve ricoprire interamente e precisamente il volume del difetto lavorando tramite frese un unico blocco di materiale sintetico o naturale.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di definire una procedura per la realizzazione automatizzata di un innesto sintetico da impiantare a pazienti che presentano difetti a livello mandibolare partendo da immagini tomografiche. L'innesto dovrà avere forma coincidente con quella del difetto e la procedura non dovrà essere costosa, in quanto non si vuole andare ad incidere eccessivamente sul costo del trattamento.

Sono stati analizzati vari studi di chirurgia ricostruttiva di ossa del volto, specialità chirurgica che ha come obiettivo il ripristino delle normali strutture anatomiche e funzionali in seguito ad una resezione oncologica, un trauma o una malformazione facciale. In essi si nota come l'avvento delle nuove tecniche di imaging e di prototipazione rapida abbia reso possibile lo sviluppo di metodologie più accurate rispetto alle prime ricostruzioni basate totalmente sulla abilità del medico.

La Prototipazione Rapida indica una serie di tecnologie che consentono la produzione di oggetti di geometria complessa in tempi molto ridotti a partire dalla definizione matematica dell'oggetto stesso realizzata su un modello tridimensionale progettato al computer. La prima introduzione in ambito di chirurgia maxillo-facciale ha visto la realizzazione fisica del modello tridimensionale della mandibola del paziente: il modello è stato utilizzato appropriatamente per definire l'entità della demolizione e modellare manualmente la placca ricostruttiva [2]. Sviluppi successivi hanno portato alla mondializzazione virtuale di templare da utilizzare nella mondializzazione dell'innesto [3]. Tra i vantaggi introdotti da queste nuove tecnologie ci sono la diminuzione del tempo di esposizione ad anestesia, diminuzione della perdita di sangue, diminuzione del tempo a ferita aperta [2][3].

Nel presente lavoro di tesi si adotta il metodo della prototipazione rapida indiretta, che prevede la realizzazione di uno stampo la cui cavità coincide con la forma del difetto, dentro il quale verrà colato il materiale scelto come sostituto osseo [4]. L'innovazione proposta è quella di utilizzare un materiale idrosolubile in modo da garantire una semplice estrazione del pezzo dalla stampo, semplicemente immergendo il tutto in acqua. In questo modo è facilitata anche la fase di progettazione, non dovendo, ad esempio, garantire l'assenza di sottosquadri. Tra le varie tecniche a disposizione è stata utilizzata una tecnologia open source Fused Deposition Modelling, con PVA come materiale di stampa.

Il lavoro ha previsto l'analisi dell'intera procedura, dall'estrazione delle informazioni dalle bioimmagini alla fabbricazione dell'innesto.

L'estrazione delle informazioni può essere suddivisa nelle seguenti fasi di lavoro: segmentazione, identificazione del difetto e progettazione dello stampo.

Questi passaggi sono effettuati sfruttando solo software open source oppure attraverso l'implementazione di apposite funzioni scritte in linguaggio C++. Segue la realizzazione fisica dello stampo mediante tecnologia Fused Deposition Modelling.

La seconda parte inizia con la scelta e caratterizzazione del materiale da utilizzare come sostituto osseo. Una volta scelto il materiale è colato all'interno dello stampo: successive prove e modifiche, realizzate su stampi cilindrici, hanno guidato il design dello stampo e la procedura di preparazione verso la soluzione definitiva.

La struttura della tesi è la seguente: nel capitolo 1 è inquadrato il problema dei difetti ossei a livello maxillo-facciale, andando a descrivere le tecniche chirurgiche classiche ed innovative oggi adottate. In particolare è mostrato il problema dei ritiri ossei a livello gengivale, al quale questo lavoro di tesi vuole proporre una soluzione innovativa.

Nel capitolo 2 è mostrata una panoramica della prototipazione rapida, della quale sono descritti i concetti di base e le varie tecnologie a disposizione. È di seguito analizzata l'introduzione e l'utilizzo di queste tecnologie nel campo medico, con particolare attenzione al settore della ricostruzione mandibolare. Nel capitolo 3 sono descritti i passaggi necessari per costruire lo stampo del difetto partendo dall'immagine tomografica della mandibola. Sono infine descritte nel capitolo 4 tutte le prove effettuate sugli stampi.

Bibliografia

- [1] D. Buser, K. Dula, U. C. Belser, H. P. Hirt, and H. Berthold, “Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible,” *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, vol. 15, no. 1, p. 10—29, 1995.
- [2] B. T. Kernan and J. a Wimsatt, “Use of a stereolithography model for accurate, preoperative adaptation of a reconstruction plate,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 58, no. 3, pp. 349–351, 2000.
- [3] A. Cohen, A. Laviv, P. Berman, R. Nashef, and J. Abu-Tair, “Mandibular reconstruction using stereolithographic 3-dimensional printing modeling technology,” *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 108, no. 5, pp. 661–666, 2009.
- [4] C. De Maria, A. De Acutis, and G. Vozzi, “Indirect Rapid Prototyping for Tissue Engineering.”

1 Difetti ossei a livello Maxillo-Facciale: problemi e soluzioni

Questo capitolo è focalizzato sui difetti ossei a livello maxillo-facciale e sulle tecniche chirurgiche classiche ed innovative oggi adottate. In particolare è mostrato il problema dei ritiri ossei a livello gengivale, al quale questo lavoro di tesi vuole proporre una soluzione innovativa.

1.1 Rigenerazione ossea in implantologia dentale

Per implantologia dentale si intende quell'insieme di tecniche chirurgiche atte a riabilitare funzionalmente un paziente affetto da edentulismo totale o parziale. Tali tecniche si realizzano mediante l'utilizzo di impianti dentali ovverosia dispositivi, metallici e non, inseriti chirurgicamente nell'osso mandibolare o mascellare, o sopra di esso ma sotto la gengiva, atti a permettere la connessione di protesi, fisse o mobili, per la restituzione della funzione masticatoria. Tali impianti possono essere di diverse forme, inseriti in diverse sedi con tecniche differenti e poi connessi alle protesi con diverse tempistiche. Attualmente gli impianti sono quasi tutti realizzati in titanio. Un parametro fondamentale per rendere possibile l'inserimento implantare è conoscere e valutare la quantità e la qualità di osso disponibile. Eventuali riduzioni dell'osso alveolare sia in altezza che in larghezza possono essere valutate attraverso esami di tipo radiografico e tomografico (Fig. 1.1).

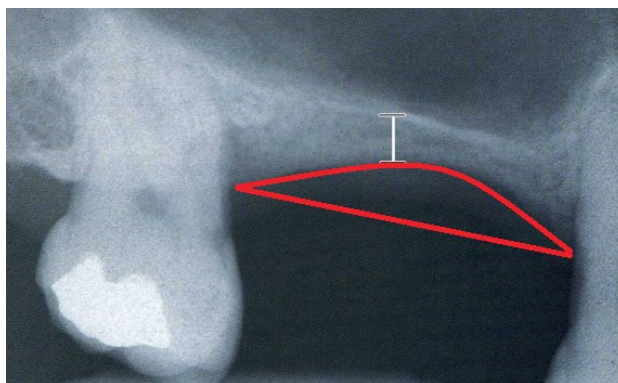


Figura 1.1: Esempio di immagine radiografica in cui è riconoscibile un ritiro osseo

Le diminuzioni di volume dei processi alveolari sono chiamate atrofie ossee, e sono

causate dalla pregressa perdita dei denti o dall'effetto distruttivo della parodontite (piorrea). La correzione delle atrofie ossee viene effettuata principalmente con la rigenerazione ossea guidata. L'obiettivo della rigenerazione ossea guidata (Guided Bone Regeneration, GBR) è quello di promuovere la formazione di nuovo osso per ricostruire una cresta alveolare atrofica prima o in concomitanza dell'inserimento implantare, attraverso l'utilizzo di membrane sia riassorbibili che non riassorbibili e materiali riempitivi di diversa natura [1]. In figura 1.2 è riportata un'immagine esplicativa della GBR.

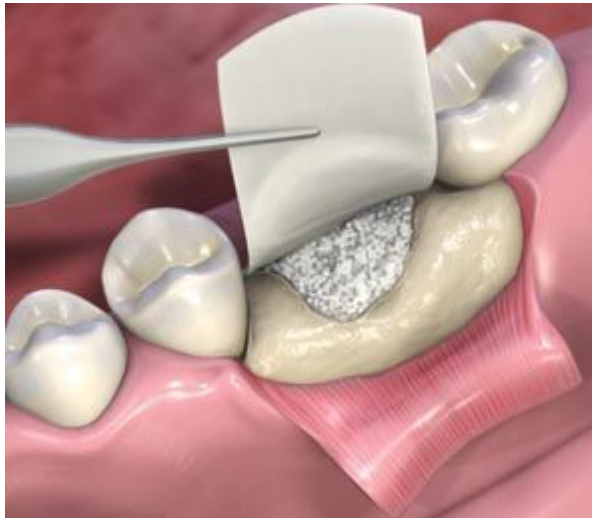


Figura 1.2: Rigenerazione Ossea Guidata

1.1.1 Le membrane

L'azione delle membrana si esplica mediante:

- la creazione ed il mantenimento al di sotto di essa di spazio protetto entro il quale andrà ad organizzarsi un coagulo ematico;
- l'esclusione dal coagulo ematico dei tessuti molli non osteogenici (cioè di quelle cellule che non sono in grado di produrre osso);
- la concentrazione locale di fattori di crescita ossea che si liberano dagli osteoblasti e da altre cellule in seguito alle lesioni ossee e dunque anche in seguito al trattamento chirurgico correlato al posizionamento degli impianti.

Le membrane si dividono in due grandi categorie: riassorbibili e non riassorbibili. Le

prime ad esser state utilizzate e quelle più ampiamente studiate sono senza dubbio le membrane non riassorbibili di politetrafluoroetilene-espanso (e-PTFE).

Il tentativo di ovviare almeno in parte alcune problematiche emerse con l'utilizzo di tali dispositivi, in particolar modo la necessità di rimuovere la membrana con un secondo intervento chirurgico, ha portato, allo studio prima e all'introduzione clinica poi, di membrane costituite da materiali che vengono degradati dall'organismo (membrane riassorbibili) [2].

1.1.2 Materiali da innesto

Al di sotto delle membrane, per evitare che esse collassino sotto la pressione dei tessuti molli che le ricoprono si possono utilizzare materiali da innesto osseo. Gli innesti ossei vanno a costituire oltre che un sostegno per le membrane stesse, un'impalcatura per gli osteoblasti implicati nel processo di rigenerazione ossea e inoltre, possono stimolare essi stessi il processo di neoformazione ossea. I materiali da innesto osseo possono essere suddivisi in [3]:

- autoinnesti: osso proveniente dallo stesso paziente,
- alloinnesti: osso proveniente da individui della stessa specie,
- xenoinnesti: provenienti da specie diverse,
- materiali alloplastici: di derivazione sintetica.

Indipendentemente dalla loro origine e dalle loro proprietà i materiali da innesto osseo devono essere non immunogenici e biocompatibili.

Gli aspetti fondamentali per la rigenerazione ossea sono:

- Osteogenesi: capacità di neogenesi ossea dell'innesto, indipendente dal sito donatore. Essa ha luogo quando viene promossa la formazione e la crescita di nuovo tessuto, da parte di osteoblasti e loro precursori presenti nel sito di rigenerazione.
- Osteoconduzione: capacità dell'innesto di creare un supporto strutturale alla neoformazione ossea. Avviene quando un materiale da innesto forma un reticolo tridimensionale, che serve come impalcatura per guidare la crescita degli

osteoblasti e dei loro precursori dalle pareti del difetto. Si tratta di un processo di crescita vascolare e di invasione dell'innesto, da parte di cellule progenitrici provenienti dal tessuto ricevente, dapprima in periferia e poi con penetrazione all'interno dell'innesto.

- Osteoinduzione: capacità di un tessuto di indurre la differenziazione di cellule mesenchimali indifferenziate e pluripotenti, provenienti dal sito ricevente o dal circolo, in osteoblasti, determinando così la neogenesi ossea a livello sia dell'innesto che del sito ricevente.

Ad oggi gli autoinnesti, rappresentano la procedura standard per innesti ossei perché sono istocompatibili e non-immunogenici oltre a possedere le adeguate proprietà meccaniche. I siti donatori possono essere intraorali o extraorali. I siti donatori intraorali più utilizzati sono il mento, il corpo e il ramo della mandibola e la tuberosità mascellare. Tra i siti donatori extraorali vanno annoverati la cresta iliaca, la tibia e la calvaria. Il trapianto di osso autologo è una procedura molto costosa, e può portare a notevoli lesioni al sito donatore, deformità, cicatrici a cui si aggiungono i rischi chirurgici quali emorragie, infiammazioni, infezioni e dolore cronico. L'autoinnesto, inoltre non può essere utilizzato nei casi in cui il sito del difetto richiede grandi quantità di osso, e il suo grado di riassorbimento è imprevedibile (fino al 60% negli innesti corticospongiosi).

Gli alloinnesti sono costituiti da osso prelevato da un donatore e utilizzato in individui della stessa specie (banca dell'osso). Può essere: osso fresco congelato (fresh frozed bone, FFB), osso liofilizzato (freeze dried bone allograft, FDBA) o osso liofilizzato e demineralizzato (demineralized freeze dried bone allograft, DFDBA). Gli alloinnesti contengono molecole osteoinduttive tuttavia è discutibile se tali molecole siano presenti in forma attiva e se le loro concentrazioni siano sufficienti ad indurre una reale neoformazione ossea. Inoltre gli alloinnesti si riassorbono come gli innesti di osso autologo. Ulteriori problematiche legate all'utilizzo di tali materiali potrebbero emergere in relazione a considerazioni di carattere etico (si tratta di osso prelevato da cadavere da considerare al pari di un trapianto) e al rischio di trasmissione di malattie infettive, almeno teoricamente possibile per alcune presentazioni di questo materiale.

Gli xenoinnesti sono costituiti da materiale minerale derivato da animali o coralli o alghe a cui è stata rimossa la componente organica per ridurre immunogenicità e

rischio di trasmissione di malattie. Tra gli xenoinnesti più utilizzati va citato l'osso bovino in cui la componente organica in seguito a trattamento termico, chimico o entrambi, viene eliminata per ridurre l'immunogenicità ed il rischio di trasmissione di malattie infettive. I metodi di produzione dell'osso bovino deproteinizzato (Deproteinized Bovine Bone Minerals, DBBMs) hanno un forte impatto sul loro comportamento biologico per via del cambiamento nelle caratteristiche di superficie mostrando perciò proprietà osteoconduttive e tassi di riassorbimento molto diversi.

I sostituti ossei alloplastici essendo di natura completamente sintetica non presentano rischi di trasmissione di malattie infettive. I più utilizzati e maggiormente studiati, in quanto la loro composizione ricorda da vicino quella dell'osso, sono costituiti da diverse formulazioni di fosfato di calcio sotto forma di idrossiapatite (HA) e β -fosfato tricalcico (TCP) o combinazioni di questi chiamati fosfati di calcio bifasici.

1.1.3 Procedura chirurgica

La procedura chirurgica di ricostruzione ossea guidata è un'operazione piuttosto lunga: una volta fatta l'anestesia, il dentista deve aprire la gengiva del paziente in prossimità del difetto osseo ed inserire il sostituto osseo, che può essere sotto forma di una sostanza pastosa oppure come blocchetti rigidi. A questo punto è necessario plasmare l'innesto in modo da riempire precisamente tutto il volume del difetto: questo step rallenta molto l'operazione. Una volta raggiunta la forma desiderata ed, eventualmente, aver ricoperto il tutto con una membrana, la gengiva deve essere ricucita.

Avendo a disposizione un innesto osseo della forma perfettamente concordante con il difetto si ridurrebbe il tempo dell'operazione ed, in particolare, il tempo a ferita aperta, con un incremento della precisione, non più basata sulla manualità del chirurgo.

1.2 Chirurgia Maxillo-facciale: ricostruzione mandibolare

La chirurgia ricostruttiva di ossa e tessuti molli del volto è una specialità chirurgica che ha come obiettivo il ripristino delle normali strutture anatomiche e funzionali in seguito ad una resezione oncologica, un trauma o una malformazione facciale. Il trasferimento di tessuti autologhi prelevati da un altro distretto corporeo e rivascularizzati, detti lembi

microchirurgici, permette di ottenere in questo campo risultati esteticamente e funzionalmente soddisfacenti, avendo però un importante costo biologico in termini di tempo di recupero ed economico in termini di risorse impiegate. Negli ultimi 20 anni la pianificazione delle ricostruzioni tridimensionali veniva fatta sulla base della sola esperienza dei chirurghi. Attualmente le nuove tecniche di imaging permettono una programmazione puntuale ed oggettiva dei margini di resezione e delle dimensioni tridimensionali dei tessuti da ricostruire. Tra gli strumenti oggi a disposizione nella progettazione di un intervento demolitivo e ricostruttivo vi è la possibilità di utilizzare, nella fase di studio preoperatoria e durante l'intervento chirurgico, le tecnologie CAD-CAM (Computer-aided design/Computer-aided manufacturing) che si avvalgono dei modelli anatomici ottenuti con la metodica di prototipazione rapida. Queste tecnologie saranno argomento del capitolo 2.

1.2.1 Tecniche classiche di ricostruzione mandibolare

La ricostruzione dei tessuti mancanti viene eseguita modellando manualmente placche di osteosintesi in titanio, ed eseguendo osteomie sull'osso trapiantato in modo da adeguarlo alla placca così confezionata. Grazie alla chirurgia microvascolare oggi è possibile trasferire sulla mandibola tessuti autologhi ben vascularizzati principalmente dalla fibula e dalla cresta iliaca.

Il perone può fornire osso sufficiente a ricostruire l'intera mandibola con un modellamento semplificato dalla possibilità di eseguire osteomie segmentate che ne facilitano il posizionamento. Sull'osso trapiantato è possibile posizionare successivamente degli impianti dentari. Il lembo osseo può essere associato al muscolo flessore lungo dell'alluce o al soleo per la ricostruzione di difetti dei tessuti molli oppure ad un'isola cutanea di spessore modesto e di dimensioni fino a 30x15 cm.

Il lembo di cresta iliaca è tra i più utili nelle ricostruzioni complesse poiché può essere prelevato sfruttando tutte le sue componenti, osso, muscoli, fascia e cute. Inoltre la vascularizzazione periostale della componente ossea ne consente l'osteomia per la realizzazione di ricostruzioni tridimensionali.

Sia che si utilizzi il lembo libero di perone che quello di cresta iliaca la componente ossea del lembo per poter ricreare il contorno mandibolare deve essere fissata all'osso mandibolare nativo. Esistono varie metodiche di fissazione, tra le quali la prima

introdotta è stata l'osteosintesi a filo, che presentava però dei limiti alla stabilizzazione dell'innesto. Per questo l'utilizzo di fili metallici è caduto in disuso a seguito dell'introduzione della fissazione rigida, attraverso miniplacche e placche. Il materiale più comune è il titanio.

Le miniplacche (Fig. 1.3), sono ampiamente utilizzate, esistono in commercio di varie forme (lineari, ad L, ad H, etc...) e vengono posizionate a due o tre per ogni segmento osseo tramite viti monocorticali.

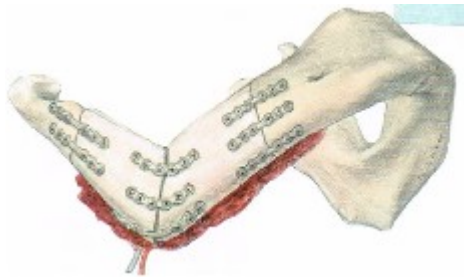


Figura 1.3: Innesto fissato con miniplacche

Le placche (Fig. 1.4), prevedono la fissazione mediante viti bicorticali con posizionamento a ponte rispetto al difetto. La rigidità di questo sistema, conferito dal maggior spessore, consente il posizionamento di un' unica placca.

Il grande vantaggio dell'impiego di placche ricostruttive in ricostruzione mandibolare risiede nella possibilità di poter modellare la placca utilizzando la mandibola nativa del paziente come un template.

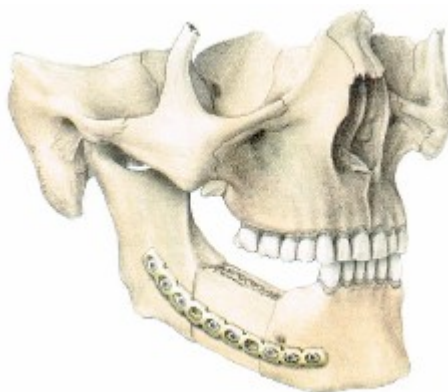


Figura 1.4: Innesto fissato con placche

1.2.2 Avvento delle tecnologie CAD/CAM in ricostruzione mandibolare

La tecnologia CAD-CAM ha aperto nuove frontiere nella ricostruzione ossea di difetti facciali: può essere utilizzata con modalità indiretta o diretta per migliorare la precisione della tecnica ricostruttiva.

La modalità indiretta prevede la realizzazione fisica del modello tridimensionale della mandibola del paziente. Tale modello è utilizzato preoperatoriamente per definire l'entità della demolizione e modellare manualmente la placca ricostruttiva. Questo metodo però presenta dei limiti di precisione.

Con l'avvento di software che permettono di poter effettuare a partire dai dati tomografici preoperatori del paziente una simulazione dell'intervento chirurgico, si sono sviluppate tecniche dette dirette. Si tratta di tecniche che hanno portato a molti risultati: l'introduzione di dime di taglio da fissare alla mandibola al fine di riprodurre i margini di resezione pianificati virtualmente[4], l'utilizzo di template modellati virtualmente sul paziente e stampati per premodellare la placca ricostruttiva prima dell'intervento [5], il calcolo della lunghezza ottimale e del posizionamento dei segmenti di fibula per la ricostruzione del difetto [6] e la modellizzazione virtuale e stampa della placca ricostruttiva utilizzata insieme alle guide chirurgiche per il taglio [7].

1.3 Ingegneria tessutale per il tessuto osseo

L'ingegneria tessutale per il tessuto osseo progetta sostituti che devono essere in grado di mimare le caratteristiche tridimensionali dell'osso autologo e allo stesso tempo favorire la ripopolazione delle cellule nel costruito [8], [9], [10].

Il paradigma classico prevede la semina e il differenziamento in vitro di cellule osteoprogenitrici autologhe su supporti tridimensionali modificati e riassorbibili detti scaffold; i costrutti così ingegnerizzati, una volta impiantati nel paziente, dovrebbero essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso. A questa tecnica sono state fatte diverse varianti.

La rigenerazione in vivo, ad esempio, prevede l'impianti scaffold senza cellule, eventualmente associati a materiali in forma di polveri, soluzioni o microparticelle caricate capaci di promuovere la riparazione locale.

Per una adeguata rigenerazione o riparazione ossea, non si può prescindere dalla conoscenza della biologia del tessuto osseo.

1.3.1 Cenni sul tessuto osseo

Le ossa svolgono varie funzioni: rappresentano il fondamento della locomozione del corpo, forniscono allo scheletro la capacità di sopportare carichi e di proteggere gli organi interni, contengono degli elementi biologici necessari per l'ematopoiesi, intrappolano metalli pericolosi (ad esempio, piombo) e mantengono l'omeostasi degli elettroliti chiave tramite lo stoccaggio di ioni calcio e ioni fosfato.

L'osso è un tessuto altamente dinamico e diversificato, sia strutturalmente che funzionalmente. La struttura macroscopica e le proprietà meccaniche delle oltre 200 ossa del sistema scheletrico umano sono ampiamente influenzate dalle specifiche condizioni di carico: le strutture scheletriche variano da ossa lunghe (come tibia, ulna) ossa brevi (come le falangi), ossa piatte (come quelle del cranio o dello sterno), e ossa irregolari (come le vertebre etc.). Il tessuto osseo può avere struttura compatta (ad es. osso corticale) o trabecolare (ad es. osso spugnoso) con enormi differenze in termini di resistenza meccanica e modulo elastico.

Nonostante queste caratteristiche e forme complesse, tuttavia il tessuto osseo ha dal punto di vista microscopico una architettura relativamente fissa: è formato da cellule e da sostanza intercellulare mineralizzata, definita matrice extracellulare (ECM, dall'inglese extracellular matrix). Esso è riccamente vascolarizzato ed è rivestito sulla superficie esterna, tranne che a livello delle superfici articolari, e sulla superficie degli spazi interni da un tessuto connettivo fibroso, definito rispettivamente periostio ed endostio.

La ECM è composta da una componente organica non mineralizzata, prevalentemente collagene di tipo I, e da una componente inorganica mineralizzata, costituita prevalentemente da cristalli di Idrossiapatite (HA, dall'inglese Hydroxyapatite). La componente organica della matrice extracellulare rappresenta il 35% del peso secco dell'osso e ne determina robustezza ed elasticità mentre la componente inorganica mineralizzata rappresenta il 65% del peso secco e conferisce al tessuto osseo compattezza e durezza .

Le cellule del tessuto osseo sono suddivisibili in osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Gli osteoblasti sono le cellule che producono la matrice extracellulare. Hanno forma generalmente cubica e sono allineati come cellule epiteliali sulla superficie della

sostanza organica che essi stessi producono. Oltre che a produrre la matrice organica del tessuto osseo, essi regolano la deposizione di quella inorganica. Nella maggior parte dei casi, rimangono murati nella sostanza intercellulare da loro deposta e si trasformano in osteociti. Gli osteociti sono le cellule del tessuto osseo maturo. Essi hanno in genere forma ellissoidale e presentano prolungamenti citoplasmatici più o meno lunghi e ramificati, attraverso i quali possono effettuare scambi metabolici tra di loro e con il sistema circolatorio. Gli osteoclasti sono deputati alla degradazione della matrice ossea. Hanno notevoli dimensioni e nella maggior parte dei casi sono polinucleati.

1.3.2 Biomateriali

I materiali utilizzati nel campo dell'ingegneria del tessuto osseo devono avere varie proprietà:

- possedere proprietà meccaniche compatibili con il tipo di applicazione;
- non indurre una risposta infiammatoria o tossica;
- essere metabolizzati dall'organismo non appena raggiunto il loro scopo, senza lasciare traccia (se bioassorbibile) o essere completamente inerte;
- essere facilmente lavorabili per il raggiungimento del manufatto finale;
- essere sterilizzabili;
- essere osteoconduttivi e possibilmente anche osteoinduttivi.

Materiali tipicamente utilizzati sono:

- Metalli: i materiali metallici risultano particolarmente adatti alla costruzione di strutture capaci di sopportare carichi senza il rischio di grandi deformazioni elastiche; per questo sono adatti alla sostituzione di tessuti duri come ossa e denti. La biocompatibilità è legata al potere corrosivo dei fluidi biologici nei loro confronti; la corrosione può determinare il rilascio di ioni metallici in sito e nel tempo il loro accumulo in altri distretti dell'organismo. I metalli e le leghe già utilizzati come biomateriali per la fabbricazione di protesi o mezzi di osteosintesi sono: ferro, cromo, cobalto, nichel, titanio, tantalio, molibdeno e tungsteno. In particolare, per le caratteristiche di biocompatibilità, resistenza alla corrosione e per le eccellenti proprietà meccaniche il titanio e le leghe di titanio sono da tempo i materiali preferiti in chirurgia orale, maxillo-facciale e ortopedica.

- Ceramiche: elementi come il calcio e il fosfato, i componenti minerali fisiologici dell'osso, si ritrovano nelle ceramiche di origine naturale e non, reperibili in varie formulazioni (come idrossiapatite, β -tricalcio fosfato e calciofosfato bifasico) e forme diverse (blocchi, cementi, rivestimenti di impianti metallici). Questi materiali sono strutturalmente molto simili all'osso e parzialmente modulabili nella porosità. L'idrossiapatite ha dimostrato essere un materiale intrinsecamente osteoconduttivo: i fattori di crescita sono naturalmente attirati e assorbiti in vivo entro le cavità della struttura porosa [9]. Fanno parte dei ceramici anche i Vetri Bioattivi: questi suscitano una risposta biologica specifica all'interfaccia, rappresentata dalla formazione di osso tra il tessuto e il materiale. Tuttavia i tempi di degradazione sono lunghi, anche dell'ordine di anni, e la scarsa resistenza meccanica al carico e all'impatto, fa considerare le ceramiche relativamente 'fragili'.
- Polimeri: i polimeri naturali come collagene, fibrina e chitosano presentano una buona biocompatibilità e alcune proprietà osteoconduttive, ma l'uso di questi materiali è limitato a causa della loro stabilità meccanica estremamente bassa. I polimeri sintetici biodegradabili offrono una straordinaria versatilità e sono ampiamente utilizzati come scaffold per l'ingegneria tissutale. Variando la composizione può essere modulata la velocità di degradazione. Tuttavia, alte concentrazioni locali di prodotti di degradazione acidi possono compromettere la crescita cellulare ed indurre una risposta infiammatoria in vivo. [11]

Con il fine di sfruttare i vantaggi offerti da materiali differenti, sono tipicamente sintetizzati materiali compositi. I compositi utilizzati come sostituti ossei presentano, come la matrice extracellulare del tessuto osseo, una fase inorganica e una fase organica. La fase inorganica è rappresentata dai materiali ceramici, tra cui HA, Fosfati di Calcio e Vetri bioattivi, che, una volta impiantati promuovono la formazione di un livello di apatite sulla loro superficie, simile a quello dell'osso. Per ovviare ai problemi presentati dai materiali ceramici si aggiunge una fase organica costituita da polimeri sintetici o naturali che permettono di produrre composti bioattivi, inerti e biodegradabili [12].

1.3.3 Scaffold: proprietà e metodi di fabbricazione

Gli scaffold sono sistemi tridimensionali progettati per supportare l'adesione e la proliferazione delle cellule, permettendo la formazione di tessuti tridimensionali. Una caratteristica fondamentale degli scaffold per la sostituzione ossea è quello di fornire integrità meccanica temporanea presso il sito del danno fino a che il tessuto osseo non venga riparato o rigenerato e vengano ripristinate le normali funzioni biomeccaniche. Affinché uno scaffold per il tessuto osseo sia funzionale immediatamente dopo l'impianto, le sue proprietà biomeccaniche devono corrispondere alle caratteristiche fisiche del tessuto osseo sano circostante.

Oltre alla composizione chimica dei materiali, elementi critici in relazione alle proprietà osteoconduttive degli scaffold e quindi ai fini della ricrescita del tessuto osseo e della vascolarizzazione sono la porosità e la struttura microscopica. La struttura porosa di uno scaffold (dimensione dei pori, volume e interconnessione) è un fattore essenziale per una corretta crescita e migrazione cellulare, per un adeguato flusso di sostanze nutritive, per una adeguata vascolarizzazione e una migliore organizzazione spaziale per la crescita cellulare e la produzione di ECM [13]: lo scaffold deve avere la giusta microarchitettura con pori interconnessi di diametro di 200-400µm [14].

Gli scaffold polimerici di prima generazione erano fabbricati secondo tecniche convenzionali tra cui solvent casting [15], gas foaming [16], freeze drying [17], e particulate leaching [18]. Con queste tecniche è possibile controllare la dimensione e la forma dei pori alterando le condizioni di processo, ma la fabbricazione di scaffold interamente interconnessi rimane una sfida. La bassa interconnettività dovuta alla tortuosità dei pori influenza negativamente l'invasione dello scaffold da parte delle cellule e la loro sopravvivenza. Per superare questa limitazione sono state utilizzate tecniche di prototipazione rapida (RP, dall'inglese Rapid Prototyping), una serie di tecnologie che consentono la produzione di oggetti di geometria complessa in tempi molto ridotti a partire dalla definizione matematica dell'oggetto stesso realizzata su un modello tridimensionale progettato al computer. Le RP si differenziano dalle tecniche tradizionali di lavorazioni meccaniche che operano per asportazione di materiale: opera su una base concettuale inversa, ossia per addizione di strati di materiale successivo. Queste tecniche sono ampiamente trattate nel capitolo 2. Sfruttando queste tecniche è possibile ottenere strutture tridimensionali complesse e tarare vari aspetti delle proprietà

degli scaffold come appunto la porosità, l'interconnettività, la resistenza meccanica e la degradazione. Inoltre possono essere fabbricati impianti custom sul paziente sulla base di immagini medicali, come la tomografia computerizzata (computer tomography, CT) e la risonanza magnetica (magnetic resonance imaging, MRI)[19] Nonostante negli ultimi anni ci sia stata una grande evoluzione in termini di risoluzione nel campo della prototipazione rapida, non è ancora possibile riprodurre le caratteristiche microscopiche, che sono rilevanti per simulare le proprietà fisiche della matrice extracellulare nativa. Per questo è stata introdotta la tecnica dell'elettrospinning. L'elettrospinning (ES) è una tecnica di filatura che impiega forze elettrostatiche per produrre fibre di dimensioni submicrometriche per stretching uniassiale di una soluzione durante la fase di solidificazione. Alla soluzione, contenuta in una siringa, viene applicato un campo elettrico che ne innalza il potenziale elettrostatico, in questo modo aumenta la carica superficiale fino al valore critico per cui viene vinta la tensione superficiale e la soluzione assume la conformazione nota come cono di Taylor. Sulla punta del cono si concentra lo stress elettrico e la soluzione viene accelerata verso il collettore che ha polarità opposta. Nella prima fase di estrusione la traiettoria è lineare, nel senso del campo, ma dopo un certo percorso fattori di instabilità portano a distorsioni della traiettoria che inducono l'allungamento e l'assottigliamento della fibra. Le fibre elettrofilate seguono una traiettoria a spirale e sono deposte sul collettore con struttura randomica. L'ampia area superficiale però consente la rapida evaporazione del solvente, quindi la solidificazione della fibra. L' ES è una tecnica avanzata ma semplice, poco costosa, flessibile ed efficiente. Un ulteriore vantaggio di questa tecnica è la possibilità di utilizzare una grande varietà di materiali, dai polimeri sintetici a quelli naturali e persino materiali compositi.

Al fine di sfruttare i vari vantaggi si è pensato di combinare più tecnologie per la realizzazione dello scaffold: ad esempio combinando le tecniche RP con l'elettrospinning è possibile realizzare uno scaffold con proprietà meccaniche adatte e, allo stesso tempo una micro e nano-struttura ben definita. Questo approccio è stato utilizzato da *Vaquette et al.* [20] per la rigenerazione dell'osso alveolare e del legamento periodontale.

1.3.4 Fattori di crescita

Nonostante molti sostituti ossei sintetici si sono dimostrati essere biocompatibili e osteoconduttivi, sono generalmente considerati non osteoinduttivi e questo li rende meno adatti per il trattamento di grandi difetti ossei rispetto all'osso naturale [19]. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto. Tali materiali bioattivi sono in grado di indurre localmente le cellule del tessuto ospite a rilasciare fattori di crescita, che a loro volta stimolano le cellule coinvolte nella rigenerazione del tessuto in situ. Il primo esempio è stato l'uso della BDM e successivamente delle Bone morphogenetic proteins purificate (in particolare BMP-2, -4 e -7 appartenenti alla superfamiglia del TGF- β). Questi fattori di crescita, tuttora oggetto di studio ma già applicati anche in clinica, sembrano validi induttori della rigenerazione. Attualmente però l'unico fattore di crescita approvato dal FDA statunitense è la BMP-2 applicata nella fusione lombare anteriore entro uno specifico device. Gli aspetti complessi di questa tecnica comprendono la difficoltà di legare in modo funzionale i fattori a molecole di trasporto o ai supporti, ma anche quella di modulare in maniera efficace l'emivita e il rilascio graduale. [21]

1.4 Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di definire una procedura per la realizzazione di un innesto sintetico da impiantare a pazienti che presentano difetti a livello mandibolare partendo da immagini tomografiche: l'innesto dovrà avere forma coincidente con quella del difetto e la procedura non deve essere costosa in quanto non si vuole andare ad incidere eccessivamente sul costo del trattamento.

Nel presente lavoro di tesi si adotta il metodo della prototipazione rapida inversa, che prevede la realizzazione di uno stampo la cui cavità coincide con la forma del difetto, dentro il quale verrà colato il materiale scelto come sostituto osseo.

Il lavoro sarà articolato in due parti: una parte tecnologica ed una parte di laboratorio.

La parte tecnologia riguarda l'identificazione e ricostruzione del volume del difetto osseo, che parte con la segmentazione dell'immagine tomografica della mandibola, e design dello stampo. Nella parte scientifica è scelto il biomateriale da utilizzare e sono

fatte delle prove di colata, i risultati della quale guideranno il design dello stampo verso una soluzione ottimale.

La struttura della tesi è la seguente: nel capitolo 2 sono introdotte le tecnologie di prototipazione rapida, i software sfruttati in questo campo, e l'utilizzo di queste tecnologie in campo biomedico ed in particolare in chirurgia maxillo-facciale. Nel capitolo 3 sono descritti i passaggi della parte tecnologia, dunque la segmentazione e design dello stampo. Tutti questi step sono realizzati esclusivamente utilizzando programmi open-source o implementando direttamente funzioni in C++. Nel capitolo 4 sono infine descritte tutte le prove effettuate sugli stampi che hanno portato alla realizzazione della versione finale dello stampo.

Bibliografia

- [1] D. Buser, K. Dula, U. C. Belser, H. P. Hirt, and H. Berthold, "Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible," *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, vol. 15, no. 1, p. 10–29, 1995.
- [2] M. Simion, a Scarano, L. Gionso, and a Piattelli, "Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans.," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 11, no. 6, pp. 735–742, 2015.
- [3] S. S. Jensen, M. M. Bornstein, M. Dard, D. D. Bosshardt, and D. Buser, "Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 90, no. 1, pp. 171–181, 2009.
- [4] H. Eufinger, M. Wehmöller, and E. Machtens, "Individual prostheses and resection templates for mandibular resection and reconstruction," *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 35, no. 6, pp. 413–418, 1997.
- [5] P. Dérand and J. M. Hirsch, "Virtual Bending of Mandibular Reconstruction Plates Using a Computer-Aided Design," *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 67, no. 8, pp. 1640–1643, 2009.
- [6] M.-J. Tsai and C.-T. Wu, "Study of mandible reconstruction using a fibula flap with application of additive manufacturing technology.," *Biomed. Eng. Online*, vol. 13, no. 1, p. 57, 2014.
- [7] L. Ciocca, F. De Crescenzo, M. Fantini, and R. Scotti, "CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: A pilot study," *Comput. Med. Imaging Graph.*, vol. 33, no. 1, pp. 58–62, 2009.
- [8] P. Ducheyne, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function," *Biomaterials*, vol. 20, no. 23–24, pp. 2287–2303, Dec. 1999.
- [9] U. Ripamonti, "Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models," *Biomaterials*, vol. 17, no. 1, pp. 31–35, Jan. 1996.
- [10] M. W. Chapman, R. Bucholz, and C. Cornell, "Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 79, no. 4, pp. 495–502, Apr. 1997.

- [11] M. Schicker, H. Seitz, I. Drosse, S. Seitz, and W. Mutschler, "Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering," *Eur. J. Trauma*, vol. 32, no. 2, pp. 114–124, 2006.
- [12] J. F. Mano, R. A. Sousa, L. F. Boesel, N. M. Neves, and R. L. Reis, "Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 64, no. 6, pp. 789–817, May 2004.
- [13] L. E. F. P.K. Valonen, F.T. Moutos, A. Kusanagi, M. Moretti, B.O. Diekman, J.F. Welter, A.I. Caplan, F. Guilak, "In vitro generation of mechanically functional cartilage grafts based on adult human stem cells and 3D-woven poly(ϵ -caprolactone) scaffolds," *Biomaterials*, pp. 2193–2200.
- [14] R. E. Holmes, "Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 63, no. 5, pp. 626–633, May 1979.
- [15] A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, "Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 323–330, Apr. 1993.
- [16] D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, and R. Langer, "Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents.," *Biomaterials*, vol. 17, no. 14, pp. 1417–1422, Jul. 1996.
- [17] H. Schoof, J. Apel, I. Heschel, and G. Rau, "Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 352–357, 2001.
- [18] M. B. Claase, D. W. Grijpma, S. C. Mendes, J. D. De Bruijn, and J. Feijen, "Porous PEOT/PBT scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro bone marrow cell culturing.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 64, no. 2, pp. 291–300, Feb. 2003.
- [19] A. Hadjizadeh and C. J. Doillon, "Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system.," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 4, no. 7, pp. 524–531, 2010.
- [20] C. Vaquette, W. Fan, Y. Xiao, S. Hamlet, D. W. Hutmacher, and S. Ivanovski, "A biphasic scaffold design combined with cell sheet technology for simultaneous regeneration of alveolar bone/periodontal ligament complex.," *Biomaterials*, vol. 33, no. 22, pp. 5560–5573, Aug. 2012.
- [21] F. R. A. J. Rose and R. O. C. Oreffo, "Bone tissue engineering: hope vs hype.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 292, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2002.

2 La Prototipazione Rapida

In questo capitolo è mostrata una panoramica della prototipazione rapida, della quale sono descritti i concetti di base e le varie tecnologie a disposizione. È di seguito analizzata l'introduzione e l'utilizzo di queste tecnologie nel campo medico, con particolare attenzione al settore della ricostruzione mandibolare.

2.1 Introduzione

Con il termine Prototipazione Rapida (dall'inglese Rapid Prototyping o RP), detta anche produzione additiva (dall'inglese Additive Manufacturing o AM), si vuole indicare una serie di tecnologie che consentono la produzione di oggetti di geometria complessa in tempi molto ridotti a partire dalla definizione matematica dell'oggetto stesso realizzata su un modello tridimensionale progettato al computer. [1]

La RP si differenzia dalle tecniche tradizionali di lavorazioni meccaniche: mentre queste ultime operano per asportazione di materiale, ossia ottengono la forma voluta da un blocco all'interno della quale essa già esiste, le tecniche RP operano su una base concettuale inversa, ossia per addizione di strati di materiale successivo, con la possibilità di ottenere forme anche molto complesse, impossibili da realizzare con le lavorazioni tradizionali. Si parla, infatti, di layered manufacturing (fabbricazione strato per strato).

Lo sviluppo delle tecnologia di RP è anche strettamente correlato a quello dell'applicazione dei computer in ambiti industriali, in particolare dei sistemi Computer-Aided Design (CAD), Computer-Aided Manufacturing (CAM) e Computer Numerical Control (CNC) e ad un utente finale sempre più esigente che vuole prodotti personalizzati, costruiti e funzionali in base alle sue richieste. La RP trova le sue origini verso la fine degli anni settanta quando gli americani A. Herbert, C. Hull e il giapponese H. Kodama svilupparono (indipendentemente) un sistema per la solidificazione selettiva di un fotopolimero per costruire per strati successivi un oggetto tridimensionale. Questi studi portarono C. Hull a brevettare nel 1986 un sistema definito come “stereolitografia” e a fondare con R. Fried un'azienda destinata a produrre e commercializzare tali

macchine, la 3D Systems. Nel 1987 la 3D Systems presentò la sua prima macchina per stereolitografia (SLA1); negli anni successivi, altre nuove aziende emergenti commercializzarono macchine utilizzando tecnologie alternative alla stereolitografia: Cubital, DTM, EOS, Helysys e Stratasys. Tutte queste macchine per la prototipazione rapida hanno consentito di raggiungere alti livelli di produzione sia in termini di velocità che in termini di qualità del prototipo, ma restarono pur sempre macchinari costosissimi, acquistabili solo a livello industriale. Solo negli ultimi anni questi metodi sono stati riprodotti in realtà più piccole della grande industria; un esempio è la 3D System, che ha messo in commercio stampanti 3D a basso costo, accessibili quindi a medie e piccole imprese.

Sebbene la tecnologia RP sia utilizzata nel campo del design industriale da più di tre decenni, solo nell'ultimo decennio si inizia a sfruttarla anche in campo biomedico.

2.2 Fasi del ciclo di prototipazione rapida

Tutte le tecniche di prototipazione rapida sono caratterizzate dallo stesso approccio base, che può essere schematizzato come segue [2] :

- modellazione tridimensionale e conversione in un formato di interscambio;
- controllo e preparazione;
- costruzione e postprocesso;

L'intero processo è descritto in modo schematico in figura 2.1.

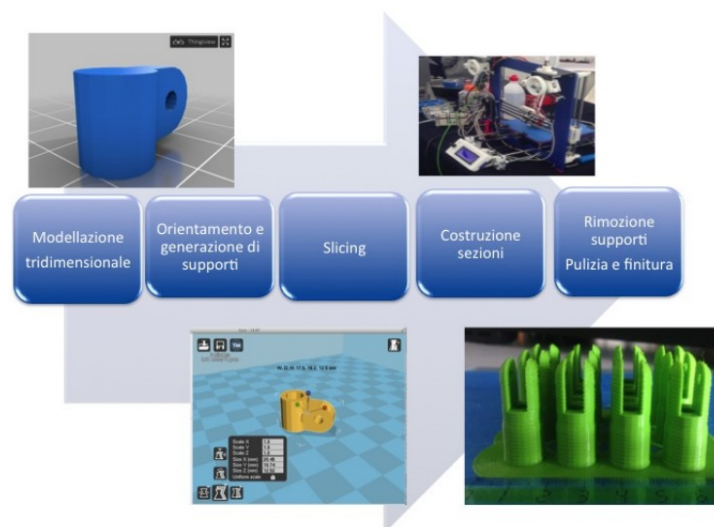


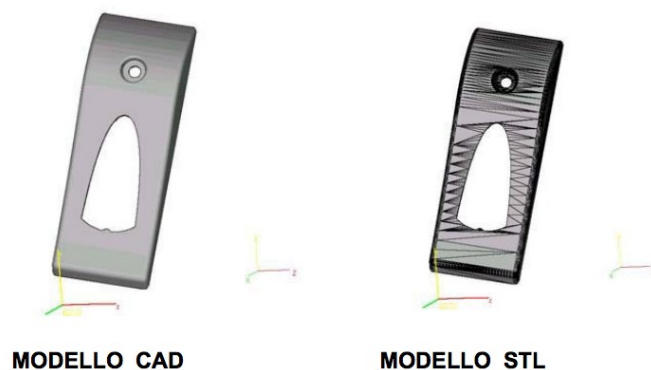
Figura 2.1: Fasi della Prototipazione Rapida

2.2.1 Modellazione tridimensionale ed esportazione in un formato di interscambio

Il ciclo di RP parte dalla modellazione tridimensionale; si possono avere due sorgenti di dati di tipo volumetrico:

- Modello CAD, realizzabile attraverso l'ausilio di software di modellazione 3D, come, ad esempio Solidworks, Autocad 3D, Blender, 123Design, etc...;
- Dati volumetrici, provenienti ad esempio nel caso biomedico da strumentazione tomografica o di risonanza magnetica: la geometria è estratta utilizzando opportuni algoritmi di segmentazione.

Il file CAD o volumetrico deve essere esportato in formato *.stl (dall'inglese STereLithography) che è uno dei formati base per lo scambio di dati in processi di prototipazione rapida. Il compito principale del formato è il trasferimento di modelli 3D a dispositivi di slicing. Attualmente la maggior parte dei programmi CAD/CAM e di segmentazione hanno la capacità di salvare il modello in formato *.stl ascii o binario. Un file *.stl viene usato per rappresentare la geometria della superficie di un modello 3D. Essenzialmente questo file contiene tutte le informazioni geometriche senza però considerare alcuna informazione di texture o colore come invece è comune per altri formati di file CAD. In un file *.stl la superficie di un oggetto viene divisa in una serie di triangoli (mesh), come si può osservare in Figura 2.2.



*Figura 2.2: Rappresentazione di un oggetto in file *.stl*

Ogni triangolo è identificato una lista di coordinate spaziali che ne identificano i vertici e da una normale alla superficie che ne identifica l'orientazione. L'accuratezza dipende dalla dimensione e di conseguenza dal numero delle maglie della mesh: mesh più fitte garantiscono una migliore qualità, ma un numero eccessivo di triangoli porta ad un file

ingestibile per la sua dimensione.

2.2.2 Da CAD a CAM

Prima di procedere con la fase di creazione del prototipo è necessario verificare che il file STL sia esente da errori. Per garantire la stampa di un modello 3D, si deve sempre tenere in mente che i modelli creati per la prototipazione rapida devono essere a “chiusura stagna”, questo significa che non ci devono essere buchi nella mesh, in quanto solo una superficie chiusa rappresenta un volume. Un altro aspetto molto importante è definito l’orientamento dei versori normali per ciascun triangoli del file STL; affinché il modello CAD sia stampabile tutti i triangoli devono avere la normale che punta verso l’esterno dell’oggetto. Se il modello nel file STL contiene una normale invertita il sistema di prototipazione non saprà più riconoscere l’interno dall’esterno dell’oggetto stesso. Inoltre è importante evitare errori nella mesh, ad esempio triangoli ridondanti o non necessari per la definizione dell’oggetto, o i “bad-edges” che possono essere causati sia da assenza di connessione tra i lati dei vari triangoli sia da intersezione tra triangoli stessi. Il controllo si fa attraverso software dedicati (MeshMixer [3], Netfabb [4]) mediante i quali, oltre a individuare e correggere gli errori presenti, è possibile modificare gli oggetti.

Dopo che sono stati eliminati gli errori il file .stl viene elaborato con software CAM, tra cui Slic3r [5], Cura [6]. Questi consentono di inserire elementi esterni al modello, quali le strutture di sostegno per le parti di sbalzo che non sarebbero altresì stampabili, parti necessarie per vincolare il modello al piano di costruzione e per protezione. Permettono di effettuare lo slicing dell’oggetto 3D da realizzare, ovvero generare le “fette” sul piano di costruzione, tipicamente indicato come xy, che sovrapposte le une alle altre lungo la direzione indicata come z daranno vita al solido finale. Questa operazione è critica perché condiziona in modo determinante la precisione del prototipo. I software CAM consentono anche altre operazioni quali scalare l’oggetto, posizionarlo e orientarlo. Un’accurata scelta dell’orientazione è importante sia per la finitura superficiale sia per ridurre i tempi di costruzione del modello 3D.

A questo punto avviene la conversione in linguaggio macchina, il Gcode: questo è composto da blocchi di istruzioni interpretabili dalla macchina di prototipazione per

muovere gli assi.

2.2.3 Post trattamenti

Alla fine della realizzazione dell'oggetto fisico spesso sono necessarie alcune operazioni manuali. Il loro scopo è togliere l'oggetto stampato dalla macchina oppure liberarlo dal supporto o dal materiale in eccesso ed eventualmente operare ulteriori finiture.

2.3 Classificazione delle tecnologie di Prototipazione Rapida

In questo capitolo si farà riferimento alla classificazione delle tecnologie RP secondo il materiale utilizzato, in base alla quale la materia prima può trovarsi inizialmente in tre diverse condizioni: liquida, polvere e solida. In figura 2.3 è riportato uno schema della classificazione.

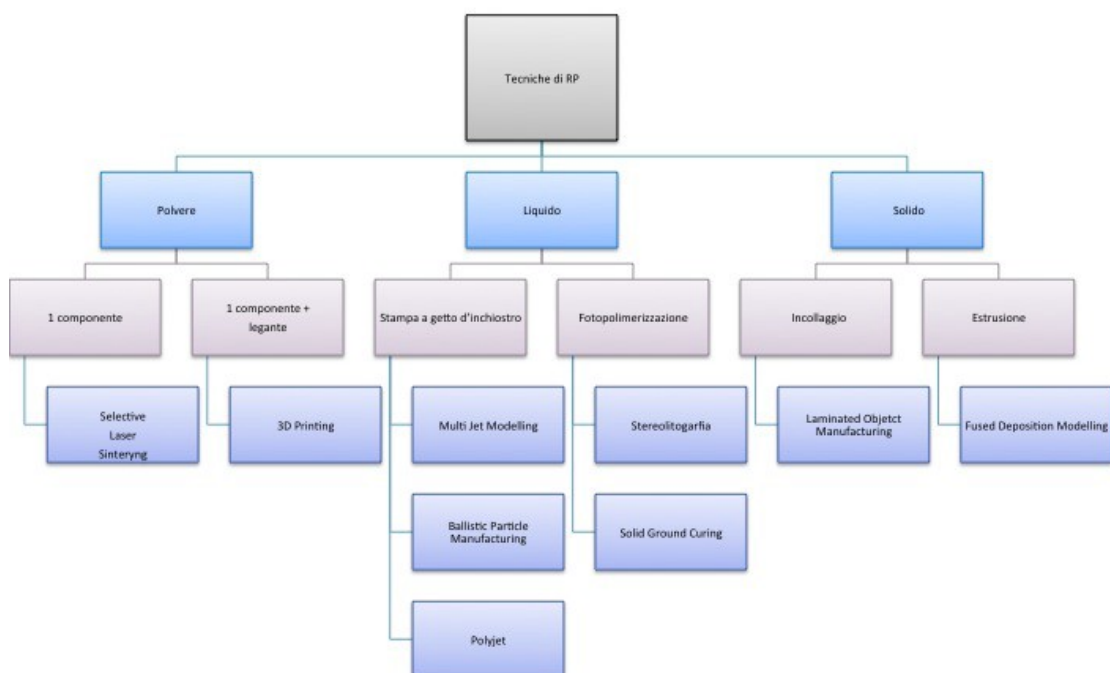


Figura 2.3: Classificazione delle tecnologie RP

2.3.1 Solidificazione di un materiale liquido

Le principali tecnologie che utilizzano materiale liquido sono:

- **Stereolitografia (SLA):** è stato il primo sistema per la prototipazione rapida reso commercialmente disponibile (la SLA1 della 3D System nel 1987) ed attualmente è il più diffuso; il processo stereolitografico è basato sulla fotopolimerizzazione. Attraverso l'impiego di un laser viene tracciata la sezione di un pezzo. Il laser cede energia, la resina polimerizza e si ottiene uno strato solido. Successivamente viene aggiunto un altro strato di materiale liquido ed il procedimento si ripete fino a che da strati successivi si ottiene il prototipo (Fig. 2.4). I fotopolimeri più diffusi per impieghi stereolitografici sono acrilici, con bassa viscosità, o resine epossidiche caratterizzate da un'alta viscosità, e impiegate laddove è necessario limitare gli errori geometrici. Non mancano però resine con proprietà assimilabili a quelle degli elastomeri o resine viniliche.

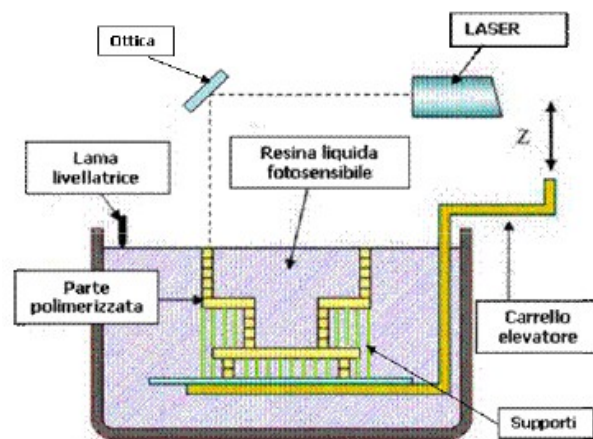


Figura 2.4: Stereolitografia: schema di funzionamento

Tecnologia CLIP (Continuous Liquid Interface Production): è un processo fotolitografico chimico che, attraverso degli attenti bilanciamenti di luce e ossigeno permette di eliminare vari step meccanici e quindi di ridurre sensibilmente il tempo di produzione. La luce viene proiettata attraverso una finestra permeabile all'ossigeno su un serbatoio di resina sensibile agli ultravioletti. La piattaforma di produzione si innalza e allo stesso tempo l'oggetto cresce. Controllando il flusso di ossigeno attraverso la finestra, CLIP

crea una “dead zone”, ovvero un fine livello di resina tra la finestra e l'oggetto. Questo rende possibile una crescita senza interruzioni: mentre la sequenza di immagini UV viene proiettata, l'oggetto è estratto dal bagno di resina (Fig. 2.5). Il grande vantaggio di questa tecnologia è rappresentato dalla sua velocità che è da 25 a 100 volte maggiore rispetto alle altre tecnologie. [7]

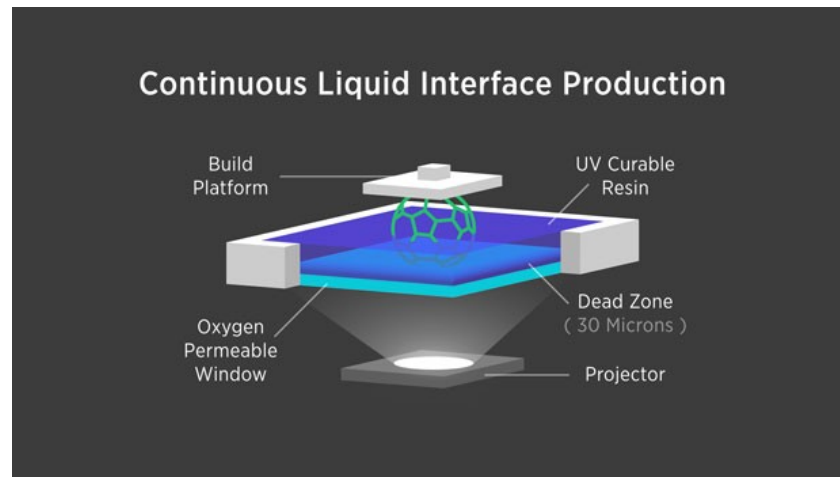


Figura 2.5: Tecnologia CLIP

- *Ink-jet Printing (IJP)*: Il principio di funzionamento di queste tecniche di prototipazione rapida è lo stesso delle comuni stampanti ink-jet o a getto d'inchiostro: si ha la deposizione di pochi picolitri di inchiostro attraverso ugelli. Le tecniche a getto d'inchiostro RP utilizzano lo stesso principio per depositare microgocce di fotopolimero (*Polyjet*), o polimero termoplastico (*Multi Jet Modelling*) per formare uno strato dell'oggetto 3D da realizzare.

Nella tecnologia Polyjet (Fig. 2.6) il fotopolimero viene espulso da degli ugelli contenuti in una testina di stampa che si muove in modo controllato nel piano X-Y, e lampade UV posizionate ai lati di questa iniziano a polimerizzarlo. Infine il fotopolimero si deposita sul pezzo e conclude la reticolazione (le micro particelle di fotopolimero durante il volo tendono a raggrupparsi a causa della reticolazione, riducendo la risoluzione). Anche questo è un processo che avviene per strati, quindi deposta la prima slice, il piano di deposizione si abbassa lungo l'asse Z della quantità necessaria e il procedimento si ripete.

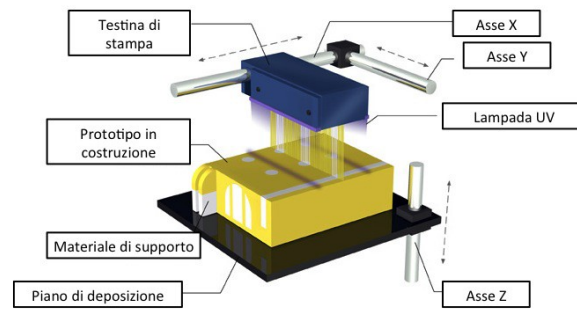


Figura 2.6: Sistema per applicazione della tecnologia Polyjet

Nella tecnologia Multijet (Fig. 2.7) il pezzo viene costruito strato su strato a partire da una piattaforma mobile dove la testa di stampa di tipo ink-jet, muovendosi nel piano, deposita un materiale termoplastico liquefatto sia per costruire il modello sia i supporti. Il materiale rilasciato dagli ugelli della testina di stampa solidifica e aderisce al precedente strato. Quando una sezione del prototipo è completata la piattaforma di costruzione si abbassa e le testine riprendono la costruzione della sezione successiva fino al completamento dell'oggetto.

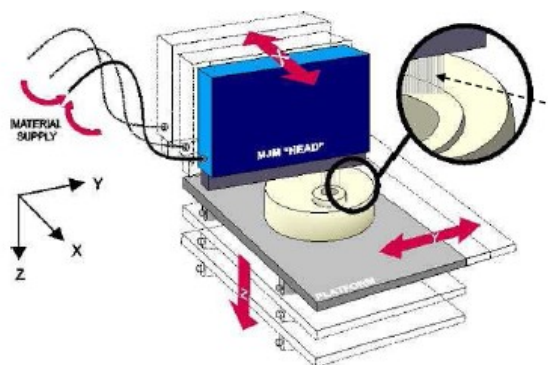


Figura 2.7: Tecnologia Multijet

- *Ballistic Particle Manufacturing (BPM)*: si basa sulla tecnologia ink-jet. Il materiale viene forzato attraverso gli ugelli presenti nella testina di stampa, ottenendo un flusso di gocce di materiale termoplastico che va a solidificarsi su un piano di deposizione. L'energia termica delle gocce depositate causa una

locale fusione sullo strato precedentemente deposto in modo che il tutto solidifichi come pezzo unico. La deposizione delle gocce sul piano è una complessa interazione tra il fenomeno di spreading della goccia quando impatta con il piano, della solidificazione e del contributo di forze viscosive e tensione superficiale. Per eliminare l'asperità dovute alla solidificazione delle gocce, vi è una fase di fresatura tra un processo di deposizione e l'altro. Il pezzo finito non richiede eccessivi trattamenti di finitura superficiale, una volta eliminate le strutture di sostegno può essere subito utilizzato.

2.3.2 Generazione dalla fase solida

In questi sistemi, ogni livello è creato tramite l'estrusione di uno strato di materiale attraverso un orifizio che si muove lungo un piano. Il materiale si raffredda, solidificandosi e fissandosi allo strato precedente. La formazione di strati successivi, uno sopra all'altro, forma un complesso oggetto tridimensionale.

Esempi di queste tecnologie sono:

- *Modellazione tramite estrusione di filamenti (dall'inglese Fused Deposition Modelling o FDM):* dopo la stereolitografia è la tecnologia più utilizzata. Un filamento di materiale plastico è viene svolto da una bobina e portato ad un ugello di estrusione. L'ugello è riscaldato per ammorbidire la plastica e ha un meccanismo che consente di attivare e disattivare il flusso della plastica fusa. La testa di stampa si muove nel piano xy deponendo materiale su un piano porta pezzo fisso; il materiale solidificherà un istante dopo essere stato depositato sul piano porta pezzo. Una volta terminato uno strato la testina si alza lungo Z (Fig. 2.8). Tutto il processo procede per strati partendo da quella inferiore fino alla realizzazione del prototipo desiderato. Per la realizzazione di modelli con parti sporgenti vi è la necessità di inserire dei supporti; per questo l'estrusore è munito di due ugelli, uno per il materiale con cui deve essere realizzato il pezzo, l'altro per il materiale di supporto. I materiali utilizzati principalmente sono Acido Poli-Lattico (PLA) e Acrionitrile-Butadiene-Stirene (ABS). Ad essi si aggiungono nuovi materiali tra cui l'Acido Poli-Vinilico (PVA), che presenta la caratteristica di solubilità in acqua.

Nella preparazione del file da stampare ci sono vari parametri da definire, i quali

vanno a determinare la qualità del prototipo finale. Tra questi il principale è l'altezza del livello: per una stampa ad alta qualità l'altezza del livello è 0.06 mm, mentre altezze di 0.1mm garantiscono una qualità buona. Diminuendo l'altezza del livello dunque si ha un aumento della qualità della stampa ma, allo stesso tempo un aumento del tempo di stampa. Deve essere inoltre decisa la velocità di stampa, che dipende fortemente dal tipo di materiale utilizzato. Questo parametro influisce sulle dimensioni del diametro del filamento: se la velocità è troppo alta il filamento viene stirato e il risultato sarà più fine; se la velocità è troppo bassa il filamento si rigonfia producendo nodi e bolle.

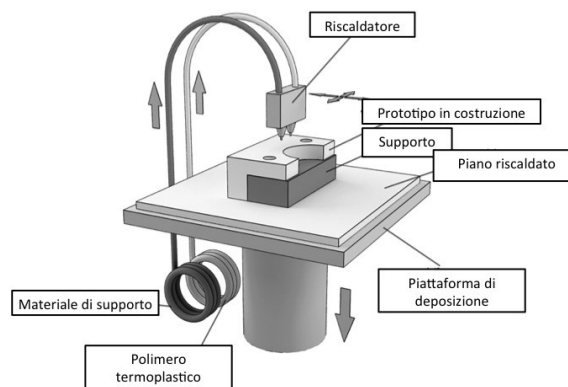


Figura 2.8: Modellizzazione tramite estrusione di filamenti

Una evoluzione di questa tecnologia è *3D Bioplotter*: essa è basata sulla erogazione 3D di liquidi e materiali pastosi in un mezzo liquido con appropriata densità. Il materiale esce dall'ugello e solidifica nel mezzo incollandosi al precedente strato.

- *Laminate Object Manufacturing (LOM)*: come mostrato in figura 7 la struttura base della macchina LOM comprende: un laser CO₂, un sistema di ottiche per focalizzare il laser, una piattaforma porta pezzo e un rullo termoriscaldato di incollaggio. Tale processo di prototipazione prevede l'utilizzo di un foglio di carta nel quale la parte inferiore è impregnata con un legante che si attiva con il calore, essa può essere a base di etil-vinil-acetato oppure a base poliuretanica reattiva. Il foglio viene steso lungo un piano, e un rullo termoriscaldato viene fatto passare sopra al foglio in modo che esso si incolli allo strato sottostante;

poi, un laser ritaglia sul foglio il contorno del prototipo (questo contorno è direttamente determinato nella sequenza di slicing); oltre a questo, fuori dai contorni il laser ritaglia, muovendosi nel piano xy, il rettangolo principale che conterrà il pezzo e una serie di quadri a contorno fisso i quali permetteranno di rimuovere il materiale in eccesso e scoprire il prototipo (Fig. 2.9). La fase successiva, ovvero quella di post-processo è quella più complessa e delicata, anche perché condotta manualmente. Una volta estratto, il modello viene trattato con uretano, resina epossidica o spray per impedire l'assorbimento di umidità e quindi la deformazione. Inoltre esso può subire operazioni di finitura in funzione dell'utilizzo a cui è destinato, ad esempio sabbiatura, lucidatura, verniciatura e lavorazioni meccaniche. Il materiale di costruzione, di costo limitato e completamente atossico, è costituito da carta rivestita nella parte inferiore da uno strato di politene e viene approvvigionata sotto forma di rotoli. Sono utilizzabili anche altri materiali, ad esempio materiali plastici termoadesivi o compositi.

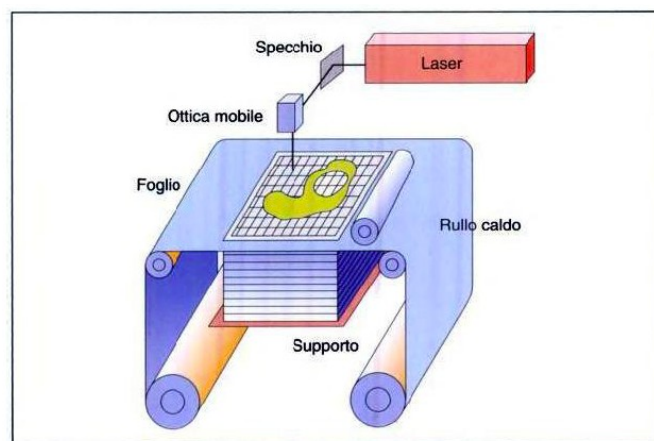


Figura 2.9: Tecnologia LOM

3.3.3 Generazione da polveri

Le principali tecnologie che sfruttano polveri come materiale sono:

- *3D Printing*: in questa metodica viene sfruttata la tecnologia ink-jet per stampare legante liquido su un substrato di polvere polimerica e realizzare livello per livello l'oggetto. In pratica viene posto e livellato uno strato di polvere sul piano di stampa, successivamente una testina ink-jet muovendosi nel piano x-y stampa

il legante nei punti desiderati e fissa tale polvere creando la sezione dell'oggetto. Questo processo si ripete fino alla creazione dell'ultima sezione (Fig. 2.10). Per la realizzazione di pezzi con sbalzi non sono necessarie le parti di supporto in quanto la polvere in cui il modello viene costruito agisce da supporto per il modello stesso. Utilizza materiali atossici (amido, gesso o polvere ceramica).

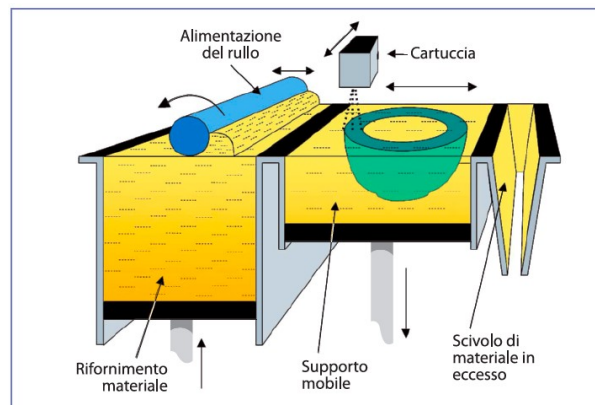


Figura 2.10: Sistema di 3D printing

- *Selective Laser Sintering (SLS)*: questa tecnologia sfrutta come materiale una polvere ultrafina. Il sistema, rappresentato in figura 2.11, prevede una piano porta pezzo, due serbatoi di polvere con i relativi piani per il rifornimento di materiale, una sorgente laser e un rullo controrotante. La creazione del pezzo avviene dal basso verso l'alto: il piano porta pezzo, prima del passaggio del rullo, abbassa l'oggetto in costruzione; i piani per il rifornimento di polvere, invece, salgono fornendo un nuovo strato di polvere; il rullo controrotante spalma questo strato lungo tutto il piano porta pezzo e lo compatta in modo da creare un piano uniforme; il laser deviato da un opportuno sistema ottico, in seguito, procede con la fusione localizzata delle polveri, lasciando inalterate quelle nelle zone circostanti. Si ha così la creazione del profilo sezione grazie alla fusione e unione dei granelli di polvere. Il procedimento si ripete fino alla creazione dell'ultima sezione. Il procedimento si ripete fino alla creazione dell'ultima sezione. Un aspetto molto importante dei materiali in forma di polveri è che consentono di non utilizzare supporti nella creazione del prototipo, infatti la loro funzione è svolta dagli strati stessi di polvere non fusa dal laser che rimangono nella camera di costruzione fino al termine del processo. Le

macchine SLS sono in grado di lavorare direttamente con un'ampia gamma di materiali: termoplastici, metalli, ceramici e compositi. La maggior parte dei materiali utilizzati sono sicuri, atossici, semplici da usare e possono essere facilmente conservati, riciclati e smaltiti.

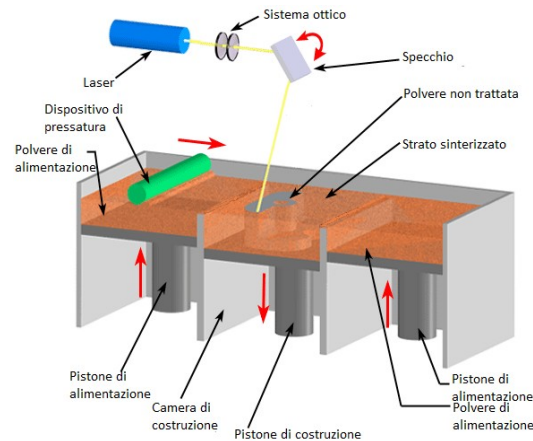


Figura 2.11: Selective Laser Sintering

2.3.4 Caratteristiche delle tecnologie RP

Le caratteristiche con le quali possiamo confrontare le varie tecnologie sono: accuratezza, costo del sistema, qualità della superficie, velocità e dimensione massima dell'oggetto.

L'Accuratezza dipende oltre che dal tipo di tecnologia utilizzata e anche dai parametri di produzione scelti. Un esempio di effetto che determina una diminuzione dell'accuratezza è lo Stair Stepping dovuto al fatto che i livelli hanno uno spessore finito. Utilizzando spessori minori questo effetto è meno evidente (Fig. 2.12).

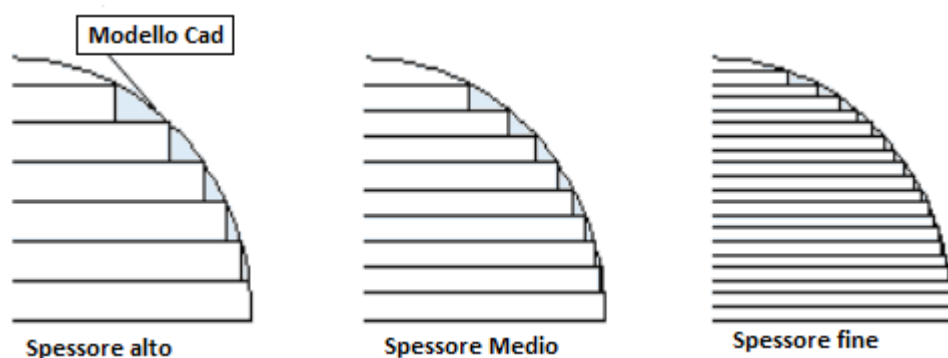


Figura 2.12: Effetto Stairstepping

Per quanto riguarda il costo del sistema dobbiamo considerare che questi tipi di tecnologie sono in genere molto costosi. Inoltre devono essere considerate anche le operazioni di manutenzione e le sostituzioni di parti del macchinario, e il costo dei materiali.

In tabella 2.1 è proposto un confronto qualitativo tra le varie tecnologie.

Tecnologia	Dimensione massima (cm)	Velocità	Accuratezza	Qualità della superficie	Costo
SLA	30x30x50	Media	Molto Buona	Molto Buona	Alto
FDM	30x30x50	Bassa	Sufficiente	Sufficiente	Medio
Wax Inkjet	30x15x21	Bassa	Eccellente	Eccellente	Medio
3D printer	30x30x40	Eccellente	Sufficiente	Sufficiente	Medio
SLS	34x34x60	Medio/Sufficiente	Buono	Sufficiente	Alto
LOM	65x55x40	Buona	Sufficiente	Sufficiente/Basso	Basso

Tabella 2.1: Confronto qualitativo tra le varie tecnologie di RP

2.4 Prototipazione rapida indiretta

Le tecniche di fabbricazione descritte prima richiedono particolari condizioni, ad esempio di pressione o di temperatura che limitano la scelta dei materiali per realizzare le strutture 3D ai polimeri sintetici; un polimero naturale come il collagene, il quale presenta una bassa temperatura di fusione (40°C) non può essere utilizzato. La realizzazione di scaffold con biomateriali può essere ottenuta con tecniche di fabbricazione indiretta, partendo da stampi sacrificali realizzati attraverso processi RP. [8]

Questo metodo dunque presenta 3 step (Fig. 2.13):

- realizzazione dello stampo con tecnologia RP;
- colata del biomateriale all'interno dello stampo;
- estrazione del pezzo

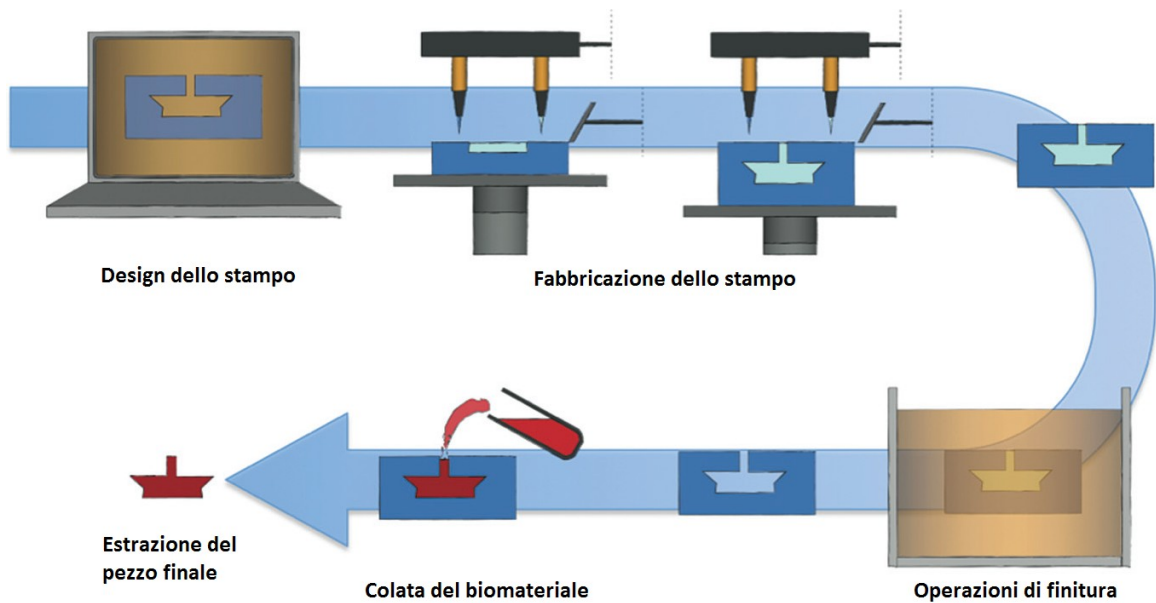


Figura 2.13: Prototipazione Rapida Indiretta: Flusso di lavoro

Questo metodo è detto Prototipazione Rapida Indiretta (iRP, dall'inglese Indirect Rapid Prototyping) e presenta vari vantaggi:

- buona qualità della forma esterna;
- ampio range di materiali e biomateriali utilizzabili che sarebbero incompatibili con altre tecniche di fabbricazione;
- minor speco di materia prima.

Nella realizzazione di scaffold un aspetto importante è la porosità: la microporosità nell'approccio iRP è raggiunta attraverso uno dei seguenti approcci:

- Critical Point dried (CPD) [9] [10];
- Free-drying [11] [12] [13];
- Leaching [14] [15] [10] [12].

Nella progettazione di stampi si devono tener presenti vari aspetti. Il primo problema che il tecnologo deve risolvere è la scelta del piano di divisione delle due parti della forma: infatti il pezzo deve poter essere estratto dalla forma stessa senza che si danneggi. Le parti del modello che, durante l'estrazione rovinerebbero la forma si

dicono sottosquadri o controsformo. Esistono infinite soluzioni a questo problema, tante quanti sono i piani di divisione di un modello: queste devono essere esaminate per trovare, se esiste quella adatta. Se la soluzione non esiste, e questo capita spesso anche per pezzi non molto complessi, si può ricorrere ad uno dei seguenti metodi:

- modifica del progetto: il progettista apporta modeste variazioni al progetto che pur conservano la funzionalità prevista, evitino problemi di sottosquadro;
- tasselli: consiste nell'utilizzare tasselli preparati separatamente, in pratica delle normali anime montate a sbalzo nella forma, inseriti nelle cavità ottenute prevedendo idonee portate d'anima sul modello;
- modello scomponibile: tale metodo consiste nel realizzare la parte in sottosquadro del modello mobile rispetto al resto del modello.

L'operazione di estrazione del modello dalla forma appena costruita è detta sformatura: si tratta di un'operazione delicata in quanto, se non eseguita correttamente può provocare danni al modello. Per agevolare questa operazione i modelli devono essere costruiti in modo da eliminare o ridurre al minimo le superfici perpendicolari al piano di divisione, ciò si ottiene inclinando tali superfici di un piccolo angolo, detto angolo di sformo.

I materiali subiscono spesso una contrazione volumetrica nell'intervallo compreso tra la temperatura di colata e quella ambiente: ne segue che il getto risulta di dimensioni inferiori a quelle delle forma. Per risolvere questo problema la forma deve essere di dimensioni opportunamente maggiorate rispetto alle dimensioni desiderate.

Considerando che gli scaffold hanno una struttura fragile spesso l'estrazione meccanica di esso dalla stampo può causare la sua rottura o la perdita di alcune proprietà. Per ovviare a questo e evitare i problemi di progettazione, lo stampo viene spesso progettato come un unico blocco che, una volta solidificato il polimero, viene dissolto attraverso un procedimento chimico e/o fisico. Ad esempio *Chu e collaboratori (2001)* [16] per estrarre impianti a base di HA dallo stampo, sottopongono il tutto ad alta temperatura ($>1000^{\circ}\text{C}$), che causa la dissoluzione dello stampo per pirolisi, ottenendo anche la sinterizzazione dell'impianto. Stessa tecnica viene adottata anche in altri studi [17], [18], [19], [20], [21] e [22]. La pirolisi richiede una specifica strumentazione e la procedura è piuttosto lunga. In altri lavori, [23] e [24] gli stampi sono disciolti in una soluzione di idrossido di sodio, NaOH. Soluzioni alternative prevede l'immersione in solventi

organici [9], [25], [26], [11], [27] e [15]. Questa procedura è lunga, circa 12 ore, e spesso sono necessarie ulteriori procedure per garantire assenza di solvente tossico all'interno dello scaffold [8].

Sfruttando la iRP è necessario verificare che il polimero non abbia assorbito sostanze dallo stampo: è dunque opportuno verificare la purezza e la composizione dell'oggetto finale mediante ad esempio spettroscopia ad infrarossi, diffrazione di raggi x e spettrometria con UV visibili [9].

Altro aspetto da considerare è la bagnabilità della superficie interna dello stampo: spesso per migliorarla, lo stampo è sottoposto a trattamenti chimici [8].

L'innovazione proposta è quella di utilizzare un materiale idrosolubile per la costruzione dello stampo in modo da garantire una semplice estrazione del pezzo finale, semplicemente immergendo il tutto in acqua. Tra le varie tecniche a disposizione è stata utilizzata una tecnologia open source Fused Deposition Modelling, con alcol polivinilico (PVA) come materiale di stampa.

2.5 Prototipazione Rapida in Medicina

La prototipazione rapida è stata introdotta nell'area biomedica e ha trovato applicazione inizialmente nella fabbricazione di modelli. La produzione di una replica dell'anatomia del paziente semplifica le procedure chirurgiche e protesiche. I modelli, infatti possono essere utilizzati in fase di pianificazione e simulazione chirurgica, nella fabbricazione di impianti personalizzati e di protesi maxillofacciali, nella comunicazione tra medico e paziente come supporto al consenso informato. Il grande vantaggio presentato da questa introduzione è una riduzione del tempo chirurgico del 20% [12].

L'esperienza riportata in letteratura nell'utilizzo della prototipazione rapida è notevole ed abbraccia vari campi della medicina (Tab. 2.2).

Anno	Tecnica di prototipazione	Scopo
1999	RP medica (MRP)	Guida chirurgica per impianti in titanio
1999	Stereolitografia	Protesi auricolari
2002	Stereolitografia	Socket protesica
2002	CAD/CAM	Socket protesica
2004	Differenti tecniche RP	Protesi maxillofacciali
2004	CAD/CAM	Protesi maxillofacciali
2004	CAD/CAM	Protesi auricolari
2005	Differenti tecniche RP	Chirurgia orale e maxillofacciale e Applicazioni ortopediche
2005	Differenti tecniche RP	RP in Sud America
2005	CAD/CAM associata	
2005	Allo specchio dell'immagine	Protesi auricolari
2005	RP medica (MRP)	Guide chirurgiche
2006	Stereolitografia	Guide chirurgiche
2004	CAD/CAM associata con scansione laser	Protesi auricolari
2007	CAD/CAM costruzione virtuale	Protesi auricolari
2006	Stereolitografia	Protesi auricolari
2007	Stereolitografia	Protesi facciali
2008	Stereolitografia	Guide chirurgiche
2009	CAD/CAM	Protesi auricolari
2009	CAD/CAM	Review su Odontoiatria
2009	Stereolitografia	Ricostruzione Mandibolare

Tabella 2.2: Applicazioni dei metodi di Prototipazione in medicina [28]

Poiché lo scopo principale dei metodi di RP è di migliorare la precisione rispetto all'intervento fatto direttamente dal chirurgo è opportuno verificare se, con queste risorse si ottiene davvero un incremento di qualità.

Un parametro che deve essere dunque valutato è l'accuratezza, che influisce sul risultato della applicazione clinica. Vari studi hanno valutato le differenze tra i prototipi realizzati con una o più tecnologie di prototipazione rapida e l'osso nativo. I risultati di questi studi sono raccolti in Tabella 2.3.

Tecnologia	Differenza Media Assoluta	Autore
Stereolitografia	0.62 ± 0.35mm	Choi et al (2002) [33]
Stereolitografia	0.608 ± 0,096mm	Taft et al (2011) [34]
Stereolitografia	0.23 ± 1,37mm	Nizam et al (2006) [35]
Selective laser sintering	0.89mm	Silva et al (2008)[36]
3D Printing	1.07mm	Silva et al (2008) [36]
Selective laser sintering	0.93 ± 0.38-0.41 mm	Salmi et al (2013) [29]
3D Printing	0.44-0.80 ± 0.25-0.51 mm	Salmi et al (2013)[29]
Tecnologia PolyJet	0.20 ± 0.14 mm	Salmi et al (2013)[29]
3D Printing	1.44mm	Ibrahim et al (2009) [30]
Selective laser sintering	0.90mm	Ibrahim et al (2009) [30]
Tecnologia PolyJet	1.23mm	Ibrahim et al (2009)[30]
Relativa		
Tecnologia PolyJet	0.133%	Murugesan et al (2012)[31]
3D Printing	1.67%	Murugesan et al (2012)[31]
Fused deposition model	1.73%	Murugesan et al (2012)[31]
3D Printing	0.62%	Primo et al (2012)[32]

Tabella 2.3: Differenze medie assolute e relative tra prototipo realizzato con una tecnologia RP e l'osso nativo

Un altro aspetto importante è il costo della realizzazione del modello. C'è stato un recente interesse nelle stampanti 3D a basso costo. *Olszewski e collaboratori (2014)* [14] hanno valutato l'accuratezza di una stampante economica per vedere se fosse possibile utilizzarla in ambito clinico. La stampante in questione era basata su tecnologia LOM e il materiale utilizzato era la carta. E' stato realizzato con questa un modello di mandibola che è stato confrontato con la mandibola nativa. Nello studio sono stati scelti 76 punti di riferimento rispettivamente sullo scheletro e sul modello. La posizione di ogni punto è stata misurata 20 volte utilizzando un braccio di misurazione. Poiché non era possibile posizionare l'osso e il modello nella stessa identica posizione rispetto al braccio, è stata misurata e comparata la distanza tra tutti i punti selezionati

$$AB = \sqrt{(X_A - X_B)^2 + (Y_A - Y_B)^2 + (Z_A - Z_B)^2} \quad .$$

Dopo ciò sono state valutate la differenza assoluta per ogni distanza basata sulla media di 20 misurazioni con la seguente formula:

$$\text{differenza assoluta (mm)} = |\text{distanza sullo scheletro} - \text{distanza sul modello}| \quad .$$

La differenza assoluta media è stata 0.36 ± 0.29 mm con un massimo di 1.67 mm. Questi valori sono simili a quelli presentati da oggetti realizzati con tecnologie più costose.

2.5.1 Procedure e Software per la prototipazione rapida in ambito chirurgico

Nel processo di stampa 3D nel campo medico è rilevante il software con il quale eseguire il flusso di lavoro che parte dall'immagine medica del paziente ed arriva ad un accurato modello tridimensionale.

Il flusso di lavoro prevede le seguenti operazioni [38]:

1. *Acquisizione dell'immagine del paziente*: la qualità dell'immagine medica ha diretto impatto sull'accuratezza di tutti gli step successivi.
2. *Creazione del modello 3D*: l'operazione di segmentazione consente questo passaggio.
3. *Ulteriori operazioni* tra cui:
 - *Misurazioni*: il modello 3D permette accurate misurazioni di parametri come lunghezza, angoli, volume e molti altri.
 - *Analisi delle popolazioni*: confronti statistici tra vari modelli 3D permettono di valutare la presenza di differenze tra subpopolazioni (ad esempio, tra

maschi e femmine).

- *Progettazione CAD sull'anatomia*: realizzazione di strumenti o protesi customizzati sull'anatomia di un paziente.
 - *Ricostruzione di difetti anatomici*: questa operazione può essere fatta ad esempio mediante operazioni di specchiatura di parti simmetriche. Nel caso in cui questa operazione non sia possibile si ricorre all'interpolazione con modelli standard della popolazione.
 - *Preparazione per simulazioni numeriche*: l'utilizzo di simulazioni numeriche permette una vista non invasiva del corpo umano e lo sviluppo di impianti migliori grazie alla predizione della loro funzionalità in differenti scenari.
4. *Preparazione e stampa del modello 3D*: prima di essere stampato il prototipo deve essere ottimizzato per la specifica tecnologia di stampa utilizzata. E' necessario fissare parametri che vanno ad interferire sulla qualità del pezzo finale come, ad esempio lo spessore dello strato, il posizionamento e l'orientazione dell'oggetto sul piano di stampa, e, all'occorrenza creare delle strutture di supporto.

In figura 2.14 sono riportati alcuni software che sono utilizzati in ambito biomedico e sono indicate le operazioni effettuabili con essi.

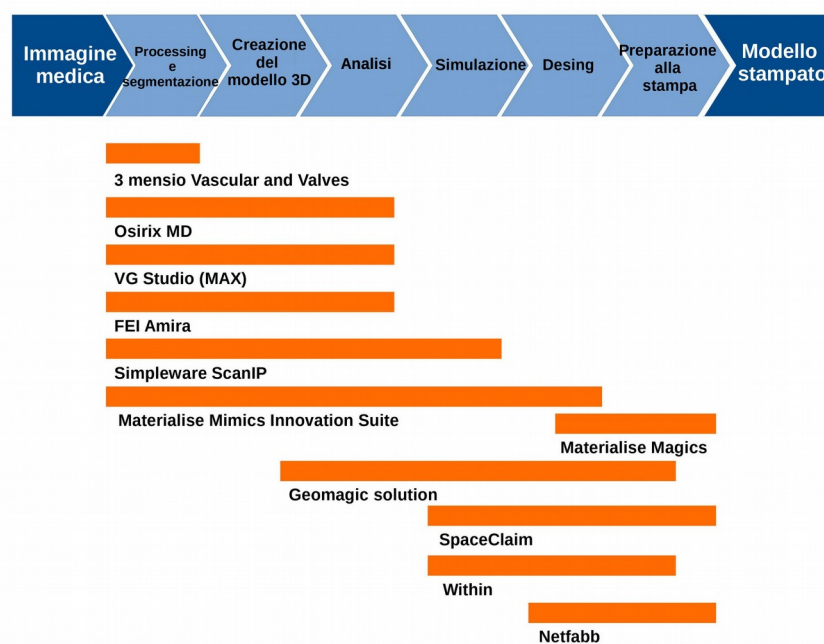


Figura 2.14: Overview su software per applicazioni biomediche [38]

3mensio è un programma per la riparazione dell'aneurisma aortico endovascolare e per l'impianto di valvole aortiche. E' possibile visualizzare immagini di vasi e valutare il livello di calcificazione o altre misure.

Osirix MD permette la acquisizione di immagine dicom e la loro analisi, e la creazione di modelli 3D. Funzioni simili sono offerte dal software VGStudio.

Amira, oltre alla manipolazione di immagini dicom e la creazione di modelli tridimensionali, permette anche di effettuare misurazioni geometriche su di essi. Scan Ip aggiunge la possibilità di fare simulazioni.

L'azienda Materialise offre 3 software: con Mimics è possibile fare acquisizione, manipolazione e segmentazione delle immagini mediche e da queste creare il modello tridimensionale; con 3-matic possono essere creati impianti o guide chirurgiche paziente specifiche. Il pacchetto Mimics e 3-matic è acquistabile come Mimics Innovation Suite. Il software Magis è utilizzato per preparare i modelli alla stampa; è possibile fare con esso anche alcune funzioni booleane, tagli, applicare texture etc. Funzioni simili sono offerte anche dal software Netfabb.

E' possibile trovare anche alcuni software open source per la manipolazione di modelli tridimensionali tra cui vengono citati quelli utilizzati nel corso di questa tesi, ovvero Meshlab e MeshMixer. Nel capitolo 3 viene mostrato il lavoro svolto con essi.

Nel paragrafo successivo viene approfondito la fase di creazione del modello 3D.

2.5.2 Software per la segmentazione

La segmentazione è la divisione di un'immagine nelle sue regioni od oggetti costituenti. Gli algoritmi di segmentazione di immagini si suddividono in due categorie in base a due proprietà dei valori di intensità [39]

- discontinuità: l'approccio è quello di cercare dei cambi bruschi di intensità (edges). Esistono tre tipi di discontinuità: punti, linee e bordi. Il metodo comune per cercare una discontinuità è quello di far scorrere una maschera attraverso l'immagine. Questo prevede un'operazione di convoluzione bidimensionale tra i coefficienti della maschera e i valori dell'immagine. Scegliendo in modo opportuno i coefficienti è possibile effettuare operazioni differenti; ad esempio nel caso della ricerca dei bordi sono fatte delle derivazioni del primo e secondo ordine.

- continuità: l'approccio è di segmentare le immagini in regioni che sono tra di loro simili rispetto ad alcuni criteri predefiniti. Alcune tra le tecniche che sfruttano questo approccio sono:
 - *Thresholding* : si supponga che l'istogramma dei livelli di grigio mostrato in figura 6 corrisponda ad un'immagine composta da un soggetto chiaro su sfondo scuro: si nota che ci sono due gruppi dominanti di livelli di grigio. Un modo semplice ed ovvio per estrarre l'oggetto è selezionare una soglia T che separi i due gruppi. Ogni punto (x,y) per il quale $f(x,y) > T$ è detto punto dell'oggetto, viceversa se $f(x,y) < T$ allora il punto appartiene allo sfondo. Nel secondo istogramma ci sono tre gruppi dominanti: ad esempio, potrebbe trattarsi di un'immagine con due tipi di oggetti di diversa intensità su uno sfondo scuro). In questo caso si fa una sogliatura multilivello per cui un punto (x,y) appartiene ad un oggetto se $T_1 < f(x,y) \leq T_2$, all'altro se $f(x,y) > T_2$ oppure allo sfondo nel caso $f(x,y) < T_1$.

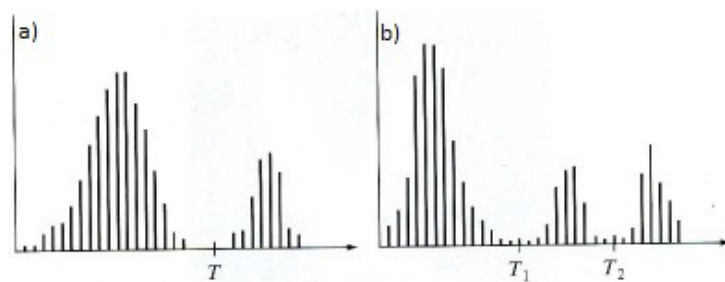


Figura 2.15: Istogrammi di immagini a cui è stata applicata l'operazione di sogliatura a singolo livello (a) e multilivello(b)

L'operatore soglia deve essere nella forma $T = T[x, y, f(x, y), p(x, y)]$, dove $f(x,y)$ indica il livello di grigio del punto e $p(x,y)$ rappresenta delle proprietà locali (ad esempio il livello medio di grigio del vicinato). Dopo la sogliatura i pixel che appartengono all'oggetto avranno valore 1, mentre gli altri valore 0. Ci sono vari tipi di sogliatura che dipendono da come viene definito T: Sogliatura Globale, Sogliatura Locale, Sogliatura dinamica.

- *Segmentazione Region Based*: l'idea di base di questo approccio è quello di dividere inizialmente l'immagine in diverse regioni che soddisfano pienamente un determinato criterio di omogeneità. Il criterio di omogeneità può essere basato su una o più caratteristiche delle regioni: livello di grigio,

tessitura, colore, informazioni statistiche, modello geometrico. Un esempio di queste tecniche è il Region Growing, una procedura che raggruppa pixel o sotto regioni in regioni più grandi basandosi su un criterio predefinito. In questo metodo è necessario individuare un punto all'interno dell'immagine e a partire da questo punto, detto seme viene fatta crescere una cosiddetta regione di interesse, in base ad una serie di regole.

Vengono riportati i vari software utilizzati in alcuni studi di chirurgia ricostruttiva.

Nel lavoro si *Tsai e Wu, 2014*, [40] il modello digitale della mandibola viene creato a partire da immagini tomografiche del cranio di adulti sani. I dati del cranio sono stati manipolati utilizzando il software MIMICS. *Cohen e collaboratori, 2009*, [41] postprocessano e convertono una immagine CT utilizzando una workstation 3D (EBW 4.0). *Olszewski R, e collaboratori, [37]* utilizzano Maxilim 3.2 che fa una segmentazione automatica dell'osso mandibolare e dei denti e converte in formato STL. *Ciocca e collaboratori, 2009*, [42] hanno scelto Amira 3.1.1 (Mercury Computer Systems, Chelmsford, MA) per creare il modello 3D attraverso una segmentazione basata su soglia, estrazione dei contorni e ricostruzione della superficie.

Data la quantità di software disponibili, si riportano alcuni confronti fatti su alcune applicazioni che si trovano in letteratura: *Weissheimer e collaboratori, 2012*, [43] hanno confrontato la precisione e l'accuratezza di 6 programmi di software di imaging per misurare i volumi delle vie aeree superiori da immagini TC. La valutazione della dimensione, forma, e il volume delle vie aeree superiori inizia definendo il volume corrispondente ai passaggi delle vie aeree, mediante segmentazione. I software utilizzati sono *Dolphin3D*, *InVivo Dental*, *Ondemand3D*, *Mimics*, *OsiriX*, *ITK-Snap*.

In particolare è stata fatta segmentazione con soglia interattiva con *Mimics*, *Dolphin3D*, *Ondemand3D*, *OsiriX* e *ITK-Snap* e segmentazione con soglia fissa con *InVivo Dental*, *Mimics*, *Ondemand3D*, *OsiriX* e *ITK-Snap*. Sono stati confrontati i volumi delle varie segmentazioni e la loro differenza dal volume calcolato al computer di 9407 mm³ (Tab. 2.4).

Programma	Volume medio della segmentazione		
	(mm ³)	Differenza (mm ³)	Differenza (%)
Soglia interattiva			
Mimics	9392	-15	-0.2
Dolphin3D	9315	-92	-1.0
OsiriX	9289	-118	-1.3
ITK-Snap	9236	-172	-1.8
OnDemand3D	8809	-598	-6.4
Soglia fissa			
InVivo Dental	8366	-1041	-11.1
Mimics	8340	-1067	-11.3
OnDemand3D	8344	-1063	-11.3
ITK-Snap	8328	-1079	-11.5
OsiriX	8310	-1097	-11.7

Tabella 2.4: confronto tra i risultati delle segmentazioni fatte con differenti programmi e metodi. [43]

Lo studio ha portato alle seguenti conclusioni:

- Tutti i 6 programmi di imaging sono stati affidabili per la segmentazione del volume ma hanno sottovalutato i valori rispetto al volume desiderato.
- I valori calcolati con Mimics, Dolphin3D, ITK-Snap, e OsiriX erano simili e considerevolmente più accurati rispetto InVivo Dental e Ondemand3D per la valutazione delle vie aeree superiori.

Altro aspetto da notare è che OsiriX e ITK-Snap sono open source.

Un altro confronto è stato quello fatto da Matsumoto e collaboratori, 2011 [44]. In questo caso si vuole creare un modello polmonare 3D da utilizzare durante l'operazione. Tre diversi programmi software (*Advantage Workstation Volum Share 4*, *OsiriX* e *CTTRY*) sono stati utilizzati per generare immagini in 3D, sulla base di dati CT. AW e OsiriX si basano su tecniche di volume-rendering appositamente progettati per le applicazioni mediche in generale, mentre CTTRY si basa su tecniche di surface-rendering, ampiamente utilizzati per i film in 3D e altre applicazioni.

Dallo studio è risultato che:

- con la collaborazione di un radiologo, AW può produrre immagini chiare, ma richiede un grande volume di dati per l'imaging e può erroneamente rappresentare le arterie di piccolo calibro e le vene che si trovano nelle

immediate vicinanze.

- OsiriX è una procedura semplice per l'imaging, ma richiede anch'esso un grande volume di dati; inoltre alcuni vasi sanguigni non sono raffigurati a seconda della densità del mezzo di contrasto.
- CTTRY richiede una piccola quantità di dati e consente la modifica dell'immagine e la chirurgia simulata. L'imaging non richiede l'uso di mezzi di contrasto, e i bronchi possono essere chiaramente raffigurati. Uno svantaggio è che l'identificazione dei vasi sanguigni richiede esperienza ed abilità dell'operatore.

Dopo queste ricerche abbiamo deciso di utilizzare come Software ITK-Snap.

2.5.3 Ricostruzione di difetti ossei maxillo-facciali

Come già accennato nel primo capitolo, le tecniche di prototipazione rapida hanno trovato varie applicazioni nell'ambito di ricostruzione dei difetti ossei livello maxillo-facciale.

La prima di queste prevede la realizzazione fisica del modello tridimensionale della mandibola del paziente: il modello viene utilizzato preoperatoriamente per definire l'entità della demolizione e modellare manualmente la placca ricostruttiva.

Un esempio di tale applicazione è mostrata dal lavoro di *Kernan e collaboratori (2000)* [45]: un modello in resina è stato realizzato con sterelitografia a partire da dati tomografici. Questo modello viene in seguito utilizzato per sviluppare il piano chirurgico, inclusa la lunghezza della resezione. In questo modo è possibile piegare ed adattare facilmente una piastra di ricostruzione al modello; inoltre il chirurgo è in grado di determinare la giusta lunghezza di essa e il numero e la lunghezza delle viti necessarie per attaccarla alla mandibola (Fig. 2.16). I vantaggi introdotti con l'utilizzo di questa metodica sono stati: diminuzione del tempo di esposizione all'anestesia, diminuzione della perdita di sangue, diminuzione del tempo a ferita aperta, garantiti dal fatto che non è stato necessario adattare la piastra alla mandibola in fase intraoperatoria.

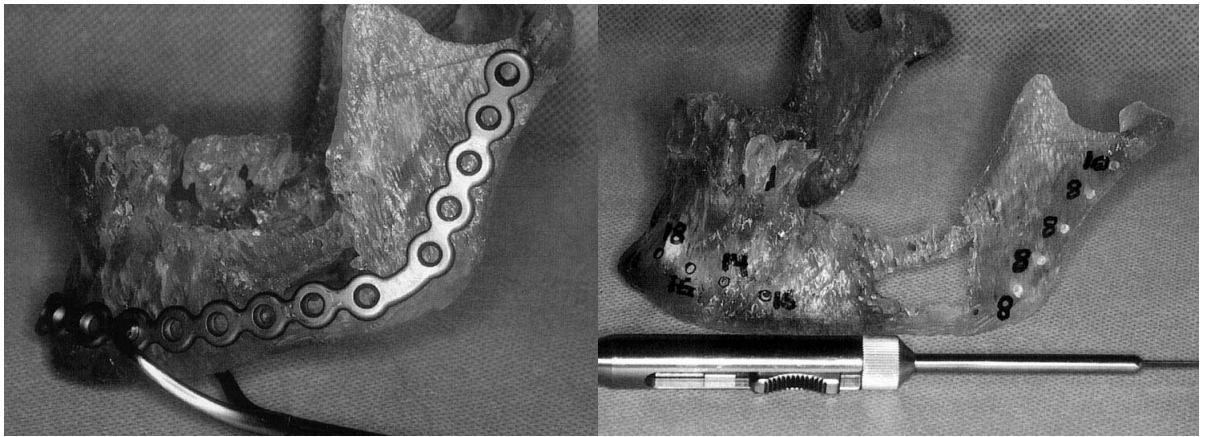


Figura 2.16: Customizzazione di una piastra per la ricostruzione della mandibola su modello realizzato con stereolitografia [45]

Cohen e collaboratori (2009)[41] dopo aver acquisito la mandibola dei pazienti con scanner CT (Brilliance 64; Philips Medical), hanno processato i dati con una workstation 3D (EBW 4.0; Philips Medical) ottenendo un modello STL. Attraverso la tecnologia Polyjet (Polyjet Technology Eden500V; Objet Geometries) il modello è stato stampato in livelli di spessore inferiore a $16\mu\text{m}$. Su questo modello sono stati pianificati i margini della resezione e viene customizzata la piastra per la ricostruzione in titanio (Fig. 2.17). Nel corso dell'operazione, dopo la resezione, la piastra è stata posizionata perfettamente e rapidamente. I benefici sono stati gli stessi presentati dallo studio precedente.



Figura 2.17: Customizzazione della piastra su modello stereolitografico[41]

In questo studio è proposta un'ulteriore introduzione: dopo un anno è stata acquisita una CT postoperatoria e convertita in formato STL. Questo file viene importato in un software per la prototipazione rapida (Magics, Materialise) nel quale viene creato un

nuovo modello utilizzando la funzione “mirror image” che sfrutta come riferimento il lato opposto della mandibola. Il modello “positivo” di uno spazio negativo è stato poi stampato e sterilizzato ed è stato utilizzato come template per creare un innesto di osso. (Fig. 2.18)

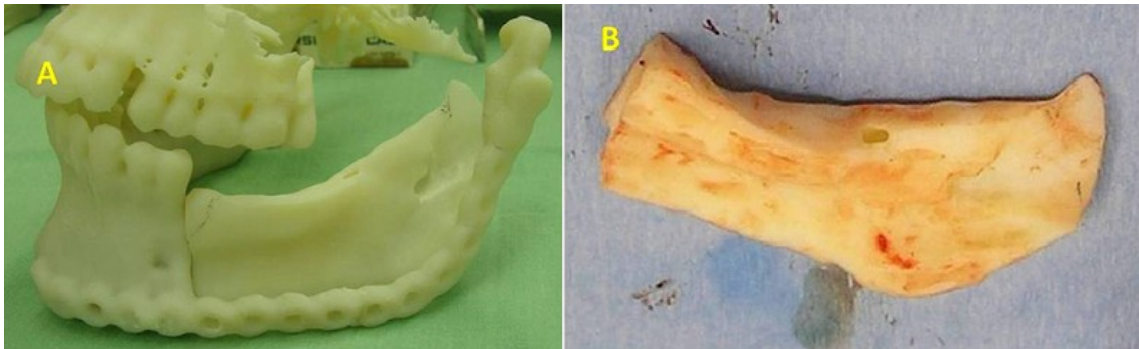


Figura 2.18: Negativo del difetto osseo stampato (A), Innesto osseo costruito fedelmente al template (B) [41]

Derand e collaboratori (2009)[46] confrontarono l'adeguatezza di piastre customizzate virtualmente con quelle adattate al modello tridimensionale. Da un esame tomografico ricostruiscono il modello utilizzando il software Osirix. Viene realizzato il template della mandibola con tecnologia stereolitografica. Il file STL viene anche importato insieme ad una piastra, anch'essa in formato STL, in un programma di animazione 3D (Maya 2008, Autodesk). In questo programma è possibile piegare virtualmente la piastra sulla mandibola (Fig. 2.19), ed una volta fatto ciò essa è stata stampata.

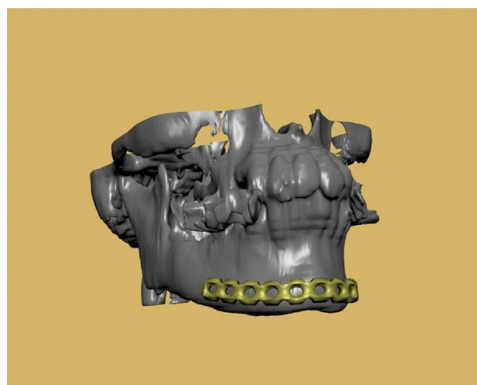


Figura 2.19: Piastra adattata virtualmente attorno alla mandibola [46]

Sono state realizzate 5 piastre utilizzando questa come template (indicate come SbR). Altre 5 piastre sono create adattandole direttamente sulla mandibola stampata, come nei metodi visti precedentemente (indicate con la sigla SDbR). L'adattamento della piastra è

stato determinato andando a misurare la distanza tra la superficie esterna della piastra e il modello stereolitografico: tutte presentano un buon adattamento per lo scopo clinico. In particolare la discrepanza media è di 1.3 mm per le SbR e 1.2mm per le SdbR. Questa differenza non ha rilevanza statistica, quindi questo studio ha dimostrato che l'utilizzo di template modellate virtualmente è possibile.

Un ulteriore approccio è quello di *Ciocca e collaboratori (2014)* [42]. Nel loro studio viene esaminata una mandibola di maiale usando CT; utilizzando il software Amira si ottiene il modello tridimensionale del ramo destro della mandibola. Su di esso viene virtualmente effettuato un taglio (Fig. 2.20a). Da questa pianificazione virtuale vengono prodotte con l'ausilio di una stampante con tecnologia fused deposition model delle guide per il taglio e uno scaffold per ricostruire il difetto. Dopo aver tagliato il ramo destro è stato fatto un confronto tra il taglio virtuale e quello fisico: la differenza media trovata era di 0.35mm e il valore massimo di 1.18 mm. Una ulteriore conferma della accuratezza dell'approccio è la precisa allocazione dello scaffold sul difetto (Fig. 2.20g)

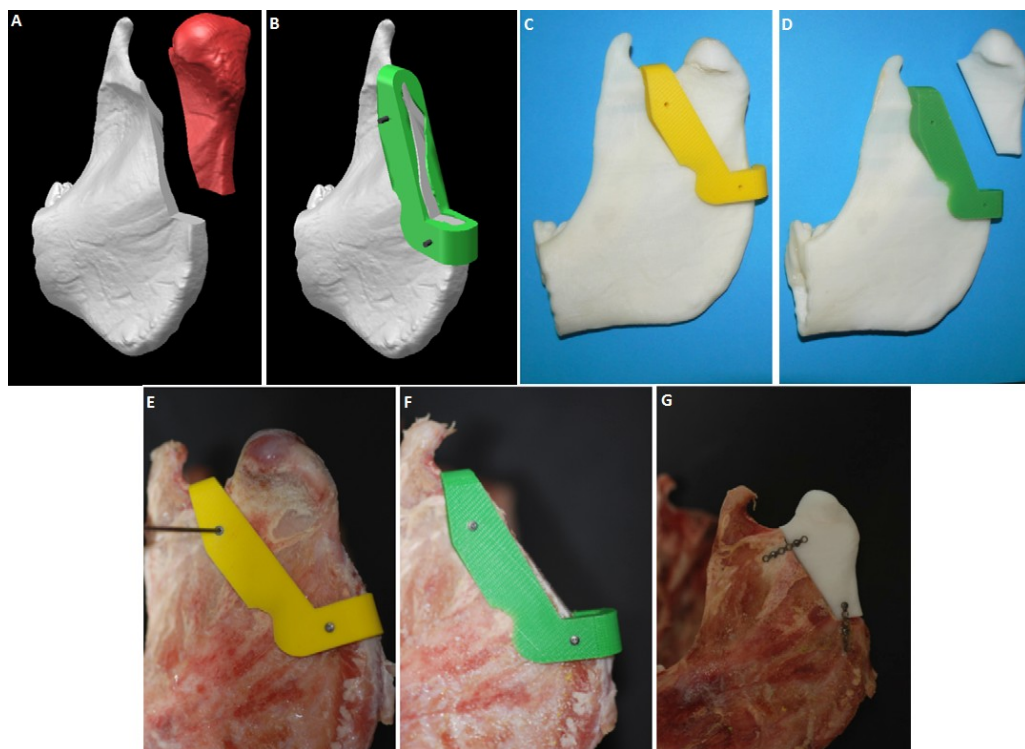


Figura 2.20: A) e B) Taglio eseguito virtualmente; C) e D) Taglio su prototipo; E) e F) Taglio su osso; G) Applicazione dello scaffold [42]

Bibliografia

- [1] A. Gebhardt, “Understanding Additive Manufacturing Rapid Prototyping - Rapid Tooling - Rapid Manufacturing,” .
- [2] C. S. L. C.K. Chua, K.F. Leong, *Rapid Prototyping: Principles and Applications*. .
- [3] “<http://www.meshmixer.com/>.” .
- [4] “<http://www.netfabb.com/>.” .
- [5] “<http://slic3r.org/>.” .
- [6] “<https://ultimaker.com/en/products/cura-software>.” .
- [7] “<http://carbon3d.com/>.” .
- [8] C. De Maria, A. De Acutis, and G. Vozzi, “Indirect Rapid Prototyping for Tissue Engineering.”
- [9] E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, and J. T. Czernuszka, “Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication.,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1487–1497, Apr. 2003.
- [10] T. Uchida, S. Ikeda, H. Oura, M. Tada, T. Nakano, T. Fukuda, T. Matsuda, M. Negoro, and F. Arai, “Development of biodegradable scaffolds based on patient-specific arterial configuration.,” *J. Biotechnol.*, vol. 133, no. 2, pp. 213–218, Jan. 2008.
- [11] L. H. Li, K. P. Kommareddy, C. Pilz, C. R. Zhou, P. Fratzl, and I. Manjubala, “In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres.,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2525–2531, Jul. 2010.
- [12] M. Lee, J. C. Y. Dunn, and B. M. Wu, “Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing.,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 20, pp. 4281–4289, Jul. 2005.
- [13] W.-Y. Yeong, C.-K. Chua, K.-F. Leong, M. Chandrasekaran, and M.-W. Lee, “Comparison of drying methods in the fabrication of collagen scaffold via indirect rapid prototyping.,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 82, no. 1, pp. 260–266, Jul. 2007.
- [14] P. Wang, J. Hu, and P. X. Ma, “The engineering of patient-specific, anatomically shaped, digits.,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 14, pp. 2735–2740, May 2009.
- [15] J. M. Taboas, R. D. Maddox, P. H. Krebsbach, and S. J. Hollister, “Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds.,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 1, pp. 181–194, Jan.

2003.

- [16] T. M. G. Chu, J. W. Halloran, S. J. Hollister, and S. E. Feinberg, "Hydroxyapatite implants with designed internal architecture," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 6, pp. 471–478, 2001.
- [17] M. Schumacher, U. Deisinger, R. Detsch, and G. Ziegler, "Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 12, pp. 3119–3127, Dec. 2010.
- [18] Y.-J. Seol, J. Y. Kim, E. K. Park, S.-Y. Kim, and D.-W. Cho, "Fabrication of a hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration using microstereolithography and molding technology," *Microelectron. Eng.*, vol. 86, no. 4–6, pp. 1443–1446, Apr. 2009.
- [19] C. E. Wilson, J. D. de Bruijn, C. A. van Blitterswijk, A. J. Verbout, and W. J. A. Dhert, "Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 68A, no. 1, pp. 123–132, 2004.
- [20] S. Bose, J. Darsell, M. Kintner, H. Hosick, and A. Bandyopadhyay, "Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 23, no. 4, pp. 479–486, Jun. 2003.
- [21] R. Detsch, F. Uhl, U. Deisinger, and G. Ziegler, "3D-Cultivation of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite scaffolds fabricated by dispense-plotting and negative mould technique," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 4, pp. 1491–1496, 2008.
- [22] S. Limpanuphap and B. Derby, "Manufacture of biomaterials by a novel printing process.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 12, pp. 1163–1166, Dec. 2002.
- [23] H.-W. Kang and D.-W. Cho, "Development of an indirect stereolithography technology for scaffold fabrication with a wide range of biomaterial selectivity.," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 18, no. 9, pp. 719–729, Sep. 2012.
- [24] J. Y. Tan, C. K. Chua, and K. F. Leong, "Indirect fabrication of gelatin scaffolds using rapid prototyping technology," *Virtual Phys. Prototyp.*, vol. 5, no. 1, pp. 45–53, 2010.
- [25] M. J. Mondrinos, R. Dembzyński, L. Lu, V. K. C. Byrapogu, D. M. Wootton, P. I. Lekes, and J. Zhou, "Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 25, pp. 4399–408, Sep. 2006.

- [26] M. J. J. Liu, S. M. Chou, C. K. Chua, B. C. M. Tay, and B. K. Ng, "The development of silk fibroin scaffolds using an indirect rapid prototyping approach: morphological analysis and cell growth monitoring by spectral-domain optical coherence tomography.," *Med. Eng. Phys.*, vol. 35, no. 2, pp. 253–62, Mar. 2013.
- [27] C. H. Park, H. F. Rios, Q. Jin, M. E. Bland, C. L. Flanagan, S. J. Hollister, and W. V. Giannobile, "Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 23, pp. 5945–5952, Aug. 2010.
- [28] M. C. Goiato, M. R. Santos, A. A. Pesqueira, A. Moreno, D. M. dos Santos, and M. F. Haddad, "Prototyping for surgical and prosthetic treatment.," *J. Craniofac. Surg.*, vol. 22, no. 3, pp. 914–917, May 2011.
- [29] M. Salmi, K.-S. Paloheimo, J. Tuomi, J. Wolff, and A. Mäkitie, "Accuracy of medical models made by additive manufacturing (rapid manufacturing).," *J. Craniomaxillofac. Surg.*, vol. 41, no. 7, pp. 603–9, Oct. 2013.
- [30] D. Ibrahim, T. L. Broilo, C. Heitz, M. G. de Oliveira, H. W. de Oliveira, S. M. W. Nobre, J. H. G. Dos Santos Filho, and D. N. Silva, "Dimensional error of selective laser sintering, three-dimensional printing and PolyJet models in the reproduction of mandibular anatomy.," *J. Craniomaxillofac. Surg.*, vol. 37, no. 3, pp. 167–73, Apr. 2009.
- [31] K. Murugesan, P. A. Anandapandian, S. K. Sharma, and M. Vasantha Kumar, "Comparative evaluation of dimension and surface detail accuracy of models produced by three different rapid prototype techniques," *J. Indian Prosthodont. Soc.*, vol. 12, no. 1, pp. 16–20, 2012.
- [32] B. T. Primo, A. C. Presotto, H. W. de Oliveira, H. T. Gassen, S. A. Q. Miguens, A. N. Silva, and P. A. G. Hernandez, "Accuracy assessment of prototypes produced using multi-slice and cone-beam computed tomography.," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 41, no. 10, pp. 1291–5, Oct. 2012.
- [33] J. Y. Choi, J. H. Choi, N. K. Kim, Y. Kim, J. K. Lee, M. K. Kim, J. H. Lee, and M. J. Kim, "Analysis of errors in medical rapid prototyping models.," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 31, no. 1, pp. 23–32, Feb. 2002.
- [34] R. M. Taft, S. Kondor, and G. T. Grant, "Accuracy of rapid prototype models for head and neck reconstruction.," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 106, no. 6, pp. 399–408, Dec. 2011.
- [35] a Nizam, R. N. Gopal, L. Naing, a B. Hakim, and a R. Samsudin, "Dimensional Accuracy of the Skull Models Produced by Rapid Prototyping Technology Using Stereolithography Apparatus," *Arch. Orofac. Sci.*, vol. 1, pp. 60–66, 2006.

- [36] D. N. Silva, M. Gerhardt de Oliveira, E. Meurer, M. I. Meurer, J. V. Lopes da Silva, and A. Santa-Bárbara, “Dimensional error in selective laser sintering and 3D-printing of models for craniomaxillary anatomy reconstruction.,” *J. Craniomaxillofac. Surg.*, vol. 36, no. 8, pp. 443–9, Dec. 2008.
- [37] R. Olszewski, P. Szymor, and M. Kozakiewicz, “Accuracy of three-dimensional, paper-based models generated using a low-cost, three-dimensional printer,” *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, pp. 1–6, 2014.
- [38] S. E. Beski Danielle, Dufour Tom, Gelaude F., ilankonav A., Kvasnytsia M., Lawewnychuk M., Lukyanenko I., Mir M., Neumann L., Nguyen A., Soares A., “Software for Biofabrication,” in *Essensial of 3D biofabrication and translation*, 2015, pp. 19–41.
- [39] R. C. Gonzales and R. Woods, “Image Segmentation,” in *Digital Image Processing*, 2002, pp. 567–642.
- [40] M.-J. Tsai and C.-T. Wu, “Study of mandible reconstruction using a fibula flap with application of additive manufacturing technology,” *Biomed. Eng. Online*, vol. 13, no. 1, p. 57, 2014.
- [41] A. Cohen, A. Laviv, P. Berman, R. Nashef, and J. Abu-Tair, “Mandibular reconstruction using stereolithographic 3-dimensional printing modeling technology,” *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 108, no. 5, pp. 661–666, 2009.
- [42] L. Ciocca, F. De Crescenzo, M. Fantini, and R. Scotti, “CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: A pilot study,” *Comput. Med. Imaging Graph.*, vol. 33, no. 1, pp. 58–62, 2009.
- [43] A. Weissheimer, L. M. de Menezes, G. T. Sameshima, R. Enciso, J. Pham, and D. Grauer, “Imaging software accuracy for 3-dimensional analysis of the upper airway.,” *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, vol. 142, no. 6, pp. 801–813, Dec. 2012.
- [44] T. Matsumoto, M. Kanzaki, M. Amiki, T. Shimizu, H. Maeda, K. Sakamoto, Y. Ookubo, and T. Onuki, “Comparison of three software programs for three-dimensional graphic imaging as contrasted with operative findings,” *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 41, no. 5, pp. 1098–1103, 2012.
- [45] B. T. Kernan and J. a Wimsatt, “Use of a stereolithography model for accurate, preoperative adaptation of a reconstruction plate.,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 58, no. 3, pp. 349–351, 2000.
- [46] P. Dérand and J. M. Hirsch, “Virtual Bending of Mandibular Reconstruction Plates

Using a Computer-Aided Design,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 67, no. 8, pp. 1640–1643, 2009.

3 Design dello stampo

In questo capitolo sono descritti i passaggi necessari per costruire lo stampo del difetto partendo dall'immagine tomografica della mandibola. Tali passaggi sono fatti solo su software open source oppure attraverso l'implementazione di apposite funzioni scritte in linguaggio C++.

3.1 Fasi di lavoro

Lo scopo di questo lavoro di tesi prevede la costruzione di uno stampo, per la realizzazione di uno scaffold customizzato sul difetto mandibolare. Dal punto di vista di processo software le fasi di lavoro sono le seguenti:

- segmentazione della mandibola;
- identificazione del difetto;
- creazione dello stampo.

3.2 Segmentazione della mandibola

La segmentazione è stata effettuata con il software ITK-Snap.

ITK-Snap è il prodotto di una decennale collaborazione tra Paul Yushkevich del Penn Image Computing and Science Laboratory (PICS�) dell'Università della Pennsylvania, e Guido Gerig del Scientific Computing and Imaging Institute (SCI) dell'Università dell'Utah, il cui scopo era creare un tool che fosse dedicato alla segmentazione e fosse facile da usare ed imparare [1]

Il software mette a disposizione vari metodi di segmentazione: segmentazione manuale e segmentazione semiautomatica che sfrutta il metodo dei contorni attivi.

Il più semplice ed intuitivo è la segmentazione manuale: per creare il volume 3D è necessario selezionare o colorare su ogni slide le parti si ritengono appartenere a tale regione. Questo metodo risulta molto lungo e poco preciso.

Per quanto riguarda la segmentazione automatica, ITK-Snap implementa due noti metodi di segmentazione basati su “active contour”: Geodesic Active Contours di Caselles e collaboratori. (1993, 1997) e Region Competition di Zhu e Yuille (1996). In

questi metodi la stima dell'evoluzione della struttura di interesse è rappresentata da uno o più contorni. Un contorno di evoluzione è una superficie chiusa $C(u,v;t)$ parametrizzata sulle variabili u , v e sul tempo t . Il contorno evolve in accordo alla seguente equazione differenziale alle derivate parziali (PDE, dall'inglese partial differential equation):

$$\frac{\partial C(t, u, v)}{\partial t} = F \vec{N} ,$$

dove \vec{N} è la normale al contorno e F rappresenta la somma delle varie forze che agiscono sul contorno nella direzione normale. Queste forze sono divise in interne e esterne: le forze interne derivano dalla geometria del contorno e sono utilizzate per imporre vincoli di regolarità nella forma del contorno, mentre le forze esterne contengono informazioni provenienti dall'immagine da segmentare. I metodi di active contour differiscono per il modo in cui definiscono le forze interne ed esterne. Caselles deriva la forza esterna dal modulo del gradiente dell'intensità dell'immagine, mentre Zhu e Yuille dalle mappe di probabilità del voxel. La forza interna è definita in entrambi i metodi come la curvatura media di C .

Nel metodo di Caselles, la forza che agisce sui contorni ha la forma:

$$F = \alpha g_I + \beta k_{g_I} + \gamma (\nabla g_I \cdot \vec{N}) ,$$

dove g_I è la funzione velocità derivata dal modulo del gradiente dell'immagine input I , k è la curvatura media del contorno, e α , β e γ sono dei pesi che modulano il contributo relativo dei tre componenti di F . La funzione velocità deve avere valori vicino a 0 in corrispondenza dei bordi dell'immagine e valori vicino ad 1 dove in corrispondenza di regioni dove l'intensità è relativamente costante. In ITK-Snap, la funzione velocità è espressa come:

$$g_I(x) = \frac{1}{1 + (NGM_I(x)/v)^\lambda} ,$$

dove NGM_I è il modulo del gradiente dell'immagine normalizzato e v e λ sono parametri fissati dall'utente che determinano la forma del mapping monotonic tra NGM_I e la funzione velocità, mostrati in figura 3.1.

Nella equazione delle forze esterne, il termine αg_I , dato che la funzione velocità è non negativa, agisce nella direzione esterna, tendendo dunque ad espandere il contorno.

Questo termine è controbilanciato dalla “advection force” $\gamma(\nabla g_I \cdot \vec{N})$ che agisce verso l'interno quando il contorno si avvicina ad un bordo al quale è parallelo.

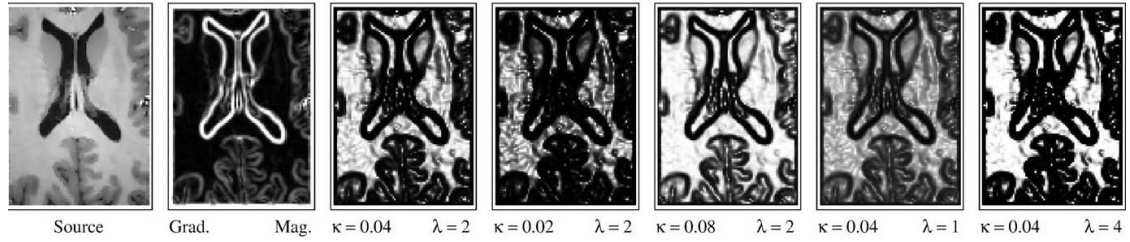


Figura 3.1: illustrazione dei parametri λ e κ che determinano la forma della funzione g che mappa i valori del modulo del gradiente dell'immagine nel range $[0,1]$.

Zhu e Yuille definiscono la forza esterna stimando la probabilità che ogni voxel ha di appartenere all'oggetto oppure allo sfondo. In SNAP, queste probabilità sono stimate usando la soglia fuzzy (Fig. 3.2). Nell'implementazione SNAP, la forza esterna è proporzionale alla differenza tra le probabilità di sfondo e di oggetto:

$$F = \alpha(P_{og} - P_{sf}) + \beta k \quad .$$

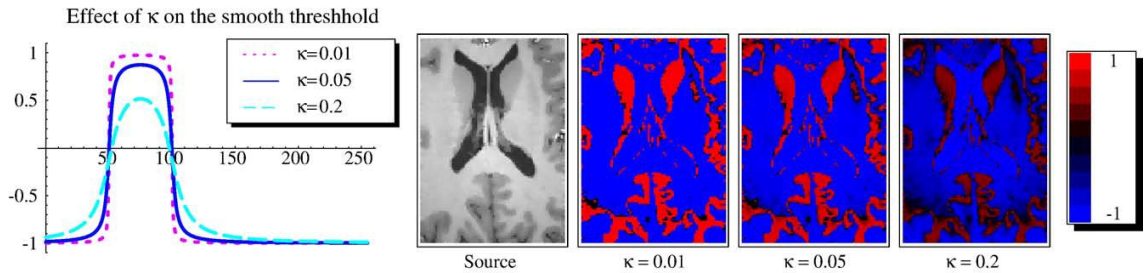


Figura 3.2: il grafico sulla sinistra mostra un esempio di tre funzioni di mappatura con differenti valori del parametro di smoothing κ . Sulla destra sono mostrate le immagini risultanti dall'applicazione delle 3 sogliature.

Andando a fare un confronto il metodo Region Competition è più appropriato quando la struttura di interesse ha un range di intensità ben definito rispetto allo sfondo, mentre il metodo di Caselles è valido quando la struttura presenta dei bordi ben definiti.

I metodi di Active Contour risolvono l'equazione di evoluzione del contorno usando il metodo level set: questo metodo garantisce la stabilità numerica e permette al contorno di cambiare topologia.

Fissare tutti i parametri che sono stati introdotti non è semplice, così ITK-Snap organizza la specifica di essi in varie operazioni. Nel primo stage l'utente decide se

utilizzare il metodo di Zhu o quello Caselles, e di conseguenza se definire la mappa di probabilità o la funzione di velocità. La mappa delle probabilità è creata andando ad applicare una soglia, che può essere singola o doppia: un feedback immediato è mostrato in modo da semplificare la scelta dei valori (Fig. 3.3a). Alternativamente è possibile importare un'immagine esterna da usare come mappa di probabilità o funzione velocità.

Nel secondo step, l'utente inizializza la segmentazione andando a piazzare uno o più semi sferici nell'immagine (Fig. 3.3b).

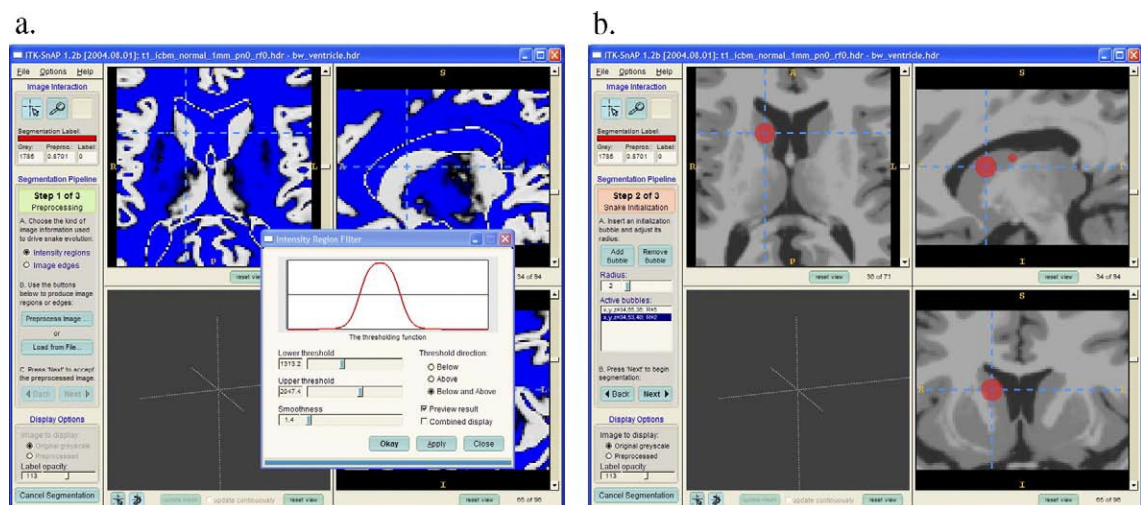


Figura 3.3: Fasi della segmentazione con ITK-Snap

L'ultimo stage è la specifica dei pesi dei vari termini dell'evoluzione del contorno PDE. ITK-Snap fornisce due metodi per scegliere i pesi. Nel modo “causal user” i pesi α , β e γ sono descritti verbalmente in termini del loro impatto sul comportamento del contorno in evoluzione, accompagnato da una curva di evoluzione 2D che mostra l'azione di ogni parametro sull'azione della forza. L'altro metodo, rivolto ad utenti più esperti, permette di definire i pesi della funzione di evoluzione.

Infine quando l'utente clicca start il contorno inizia ad evolvere fornendo sia una vista delle varie slide, sia una vista tridimensionale. L'utente può controllare e terminare l'evoluzione del contorno. [2]

In questa fase sono emersi i seguenti problemi:

- e' possibile che non vengano discriminate le due arcate dentali, inferiore e superiore (Fig. 3.4). Per ovviare a questo, una volta ricostruito il volume, è necessario tagliare la parte che non ci interessa utilizzando programmi di

manipolazione di volumi. Nel nostro caso viene utilizzato il software MeshMixer.

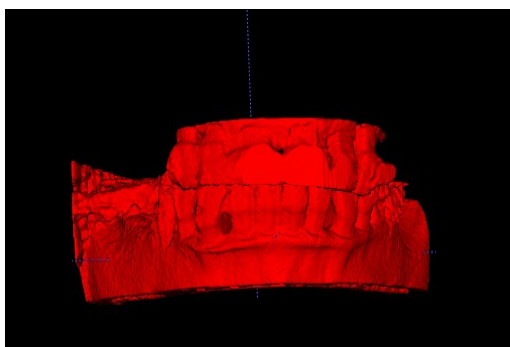


Figura 3.4: Segmentazione dell'arcata inferiore in cui però sono presenti alcuni denti dell'arcata superiore

- La presenza di viti ed otturazioni altera completamente le immagini CT a causa dell'alto coefficiente di attenuazione proprio dei metalli: si parla infatti di artefatti metallici. L'artefatto metallico appare nelle immagini come strie iper- o ipodense, tipicamente alternate tra di loro e con una caratteristica forma a stella. Questo effetto è dovuto alla combinazione di più errori, tra cui gli artefatti da volume parziale, da indurimento del fascio e da photon starvation. [3] A causa di ciò pixel effettivamente appartenenti allo sfondo hanno un valore simile a quelli dell'arcata e quindi nella ricostruzione del volume si uniscono a questa. In Figura 3.5a nel cerchio è presente una otturazione: in questa immagine una volta preprocessata si nota la presenza delle strisce bianche che non fanno parte dell'arcata (Fig. 3.5b). Anche in questo caso è necessaria una successiva manipolazione con MeshMixer per togliere le parti create da questo effetto.

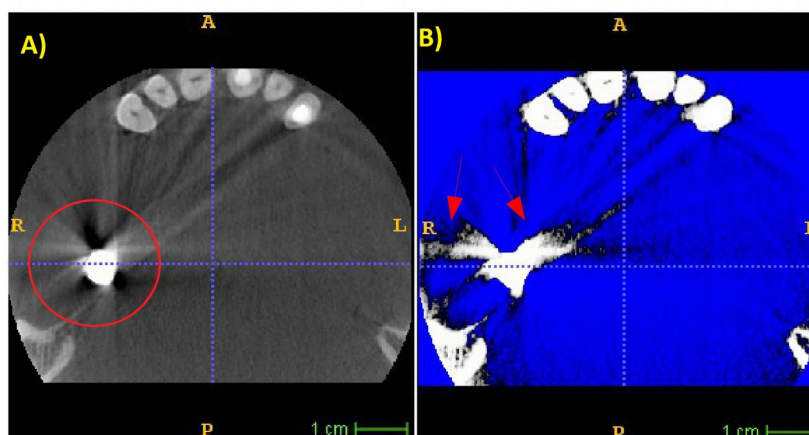


Figura 3.5: Immagine CT originale e preprocessata in cui è presente una otturazione

- L'osso della mandibola non ha una densità uniforme. A causa di ciò all'interno del mandibola si creano delle zone “vuote”. Questo deve essere evitato perché compromette le operazioni successive. Per questo devono essere controllate tutte le slide della CT e vanno aggiunte manualmente le zone interne che non sono state unite dalla segmentazione automatica. In figura 3.6 sono indicate le zone che devono essere aggiunte al volume con segmentazione automatica. Questo processo è molto lungo.

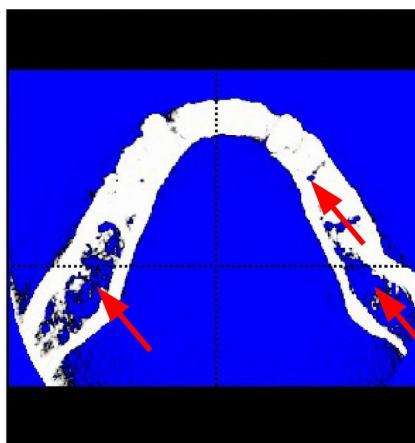


Figura 3.6: Immagine CT dell'arcata preprocessata in cui sono indicate le zone che andranno aggiunte manualmente

3.2.1 Operazioni di Finitura

Una volta terminata la segmentazione, la mandibola ha una superficie rugosa ed il numero di vertici e triangoli è molto alto. Questo rende difficile le operazioni successive come l'identificazione del difetto. Per questo il file viene processato attraverso MeshLab. MeshLab è un software che utilizza il sistema di mesh processing per sviluppare e modificare modelli 3D. MeshLab è stato sviluppato nel 2005 dall'Università di Pisa, come software per la gestione e editing di strutture geometriche non strutturate e allineate, che si acquisiscono nel processo di Scansione 3D. MeshLab mette a disposizione una serie di tool per pulire, gestire, visualizzare, modificare, renderizzare e convertire questo tipo di Geometrie. Il suo continuo sviluppo ha portato MeshLab ad essere conosciuto come software utilizzabile nei vari campi 3D, anche nell'aiuto di una costruzione di un modello 3D con metodi tradizionali. [4]

Utilizzando il software MeshLab, la mesh viene semplificata e sottoposta ad operazioni di smoothing. Le funzioni che si applicano sono le seguenti:

- *Poisson-disk Sampling*: è un'operazione di campionamento sulla mesh; i campioni sono scelti secondo la distribuzione di Poisson. L'obiettivo, dunque, è quello di fare un sampling di punti random distanti l'uno dall'altro almeno di un raggio di Poisson. La strategia è la seguente:
 - sampling molto fitto con un metodo di generazione di campioni casuali stile Montecarlo. In questo lavoro il numero è fissato a 1000000;
 - eliminazione dei campioni che stanno troppo vicino fra loro (step di pruning).
- *Poisson surface reconstruction*: partendo da un insieme di punti e normali, l'algoritmo cerca di trovare una funzione che interpola quei punti e che la cui derivata sia orientata lungo le normali stimate (di fatto sta risolvendo l'equazione di Poisson). Una volta ottenuta questa funzione implicita si utilizza una ricostruzione stile marching cubes ma in questo caso gerarchica, ovvero basata su un octree dove le celle sono distribuite in maniera adattativa a seconda della variazione locale delle normali. Devono essere definiti i seguenti parametri:
 - Octree Depth: grado dell'octree utilizzato per estrarre la superficie. Maggiore è il grado, maggiore è la precisione dell'algoritmo, ma con tempi di processo più lunghi. Questo parametro è stato fissato a 9.
 - Solver Divide: questo parametro indica il grado del risolutore Gauss-Seidel utilizzato per risolvere l'equazione. Utilizzando questo parametro si riduce l'overhead di memoria, incrementando leggermente il tempo di ricostruzione. Questo parametro è fissato a 9.
 - Sample per Node: specifica il minimo numero di punti che devono cadere all'interno di un nodo dell'octree quando la costruzione dell'octree è adattata alla densità del campionamento. Quando il campione è molto rumoroso devono essere impostati valori alti che garantiscono una ricostruzione con riduzione del rumore. Questo parametro è fissato a 3.
 - Surface offsetting: specifica un valore di correzione per la soglia di

isosuperficie scelta. Questo parametro è fissato ad 1 e indica una condizione di offsetting nullo.

- *Quadratic Edge Decimation*: questo step serve per ridurre il numero delle facce della mesh. Usa una sequenza di operazioni di edge collapse che ogni volta eliminano 2 facce lasciando invariata la topologia della mesh (numero di handles, numero di bordi, etc). La sequenza delle operazioni è determinata in maniera greedy: le operazioni che introducono minor errore nella geometria vengono eseguite prima. Il "quadratic" indica che si sta utilizzando un sistema di equazioni che consente di posizionare il vertice risultante dal collasso delle due facce nella posizione che minimizza la distanza da tutti i piani delle facce antecedenti al collasso.

In figura 3.7 è messa a confronto la stessa mandibola prima e dopo le operazioni di finitura: grazie ad esse la superficie appare più liscia e il numero di vertici e triangoli è ridotto.

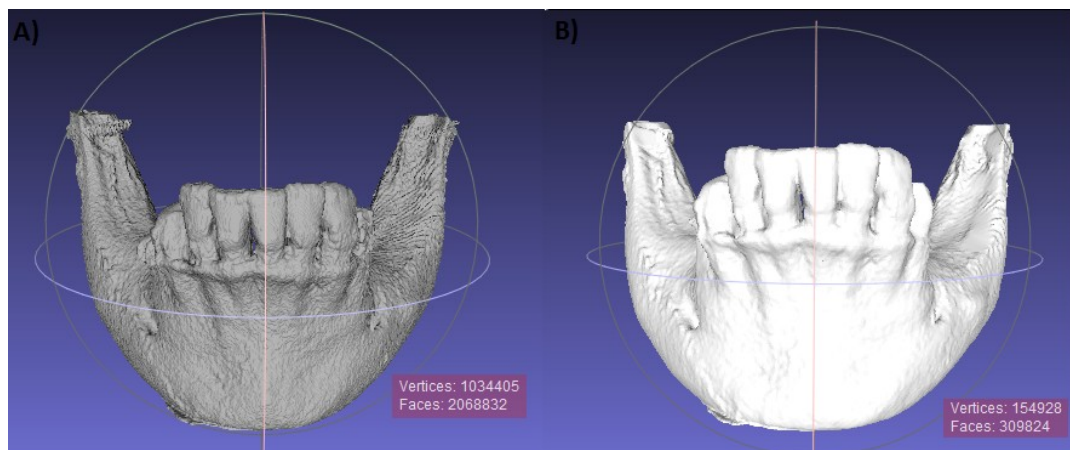


Figura 3.7: Mandibola segmentata con ITK-Snap prima (A) e dopo (B) le operazioni di finitura

3.3 Identificazione del difetto

Una volta segmentata la mandibola è necessario identificare e ricostruire il volume del difetto. E' stato condotta una ricerca in letteratura di casi simili per andare a vedere quale soluzione era stata adottata.

Nello studio di *Cohen e collaboratori, 2009*, [5] a seguito della resezione della mandibola viene fatta una CT dalla quale si vuole estrapolare il volume del difetto che

sarà poi stampato ed utilizzato come template per creare uno scaffold: una volta segmentata, la mandibola è importata nel software Magics (Materialise), con il quale viene creato un nuovo modello utilizzando una funzione di “immagine specchio” che prende come riferimento il lato contro laterale della mandibola. Soluzione del tutto simile è proposta anche da *Zhou e collaboratori, 2009*,[6]: strutture per l'innesto di osso sono state progettate utilizzando il software Geomagic studio, version 6.0 (Raindrop Geomagic, Research Triangle Park, NC). La parte intatta della mandibola viene “specchiata” per interpolare il volume del difetto. La linea centrale tra i due incisori centrali e i condili è stata considerata come piano di riflessione.

In questo lavoro di tesi si è cercato di riprodurre la funzione a specchio proposta negli studi sopra citati, utilizzando programmi open source (MeshLab, MeshMixer, Netfabb Basic) e implementando parte della funzione in C++, utilizzando Visual Studio e le librerie Insight Segmentation and Registration Toolkit (ITK) e Visualization Toolkit (VTK).

MeshMixer è un programma di mesh editing con una forte attenzione alla stampa 3D. È stato sviluppato da Ryan Schmidt e nel 2011 acquisito da Autodesk che ha ripulito l'interfaccia utente e aggiunto nuove funzionalità. [7] Netfabb Basic è la versione gratuita di Netfabb, un software per editing e la validazione dei file stl. La versione di base offre alcune funzionalità di taglio che sono sfruttate in questo lavoro di tesi.[8] ITK, da Insight Segmentation and Registration Toolkit, è una libreria open-source che permette di sviluppare tool per l'analisi di immagini [9]. VTK, da Visualization Toolkit (VTK) è una libreria open-source dedicata alla grafica, e al processo e visualizzazione di immagini. [10]

In tabella sono riportati le varie fasi e se queste vengono implementati direttamente in C++ o utilizzando delle funzioni disponibili in programmi open source.

Passi	Implementazione su C++	Utilizzo di programmi Open Souce
Specchio della mandibola	V	
Allineamento mandibola originale/specchiata		MeshLab
Sottrazione mandibola originale/specchiata	V	
Rifiniture		MeshMixer

3.3.1 Specchio

Questa funzione è implementata in C++. Le operazioni necessarie per questo punto sono:

- *Conversione della mesh in un'immagine binaria tridimensionale*: a sua volta è composto dai seguenti step:
 - lettura del file con *vtkSTLreader*;
 - conversione da *vtk* a *ItkMesh*: questa operazione è necessaria in quanto nella libreria *Itk* non sono presenti funzioni di lettura di file *STL*;
 - conversione da *ItkMesh* a immagine binaria: si utilizza il filtro *TriangleMeshToBinaryImageFilter* che analizza i punti dello spazio e pone a 255 quelli interni alla mesh, e a 0 quelli esterni. Un parametro che essere impostato è lo *spacing*, ovvero la distanza tra il punto che viene analizzato e il successivo: un valore troppo alto dello *spacing* causa una perdita della risoluzione della mesh, mentre un valore troppo basso crea un'immagine troppo grande che non è manipolabile o è difficilmente manipolabile. Il valore utilizzato nei vari casi varia da 0.1 a 0.2, compromesso tra buona qualità e costo computazionale.
- *Specchio*: si utilizza il filtro *FlipImageFilter*, il quale permette di specchiare l'immagine rispetto ad uno o più tra gli assi *x*, *y* e *z*.
- *Conversione e salvataggio dell'immagine binaria in file *.stl*: si applica il filtro *vtkContourFilter* che ricostruisce la superficie partendo dai valori dei pixel dell'immagine.

Alla fine di questo passaggio abbiamo dunque un file **.stl* della mandibola specchiata: per esso sono necessarie le operazioni di lisciatura e semplificazione implementate su *MeshMixer*.

In figura 3.8 è mostrato il risultato di questa operazione.



Figura 3.8: Mandibola originale e specchiata

3.3.2 Allineamento

Le due mandibole devono essere a questo punto allineate. Per fare questo si sfrutta un tool di MeshLab, Align Tool: si fa un allineamento Point Based Glueing, ovvero si scelgono almeno quattro punti corrispondenti sulle due mandibole (Fig. 3.9) e in base a questi viene fatto automaticamente l'allineamento. Se il risultato non è soddisfacente è possibile fare un ulteriore allineamento manuale. In figura 3.10 è mostrato il risultato.

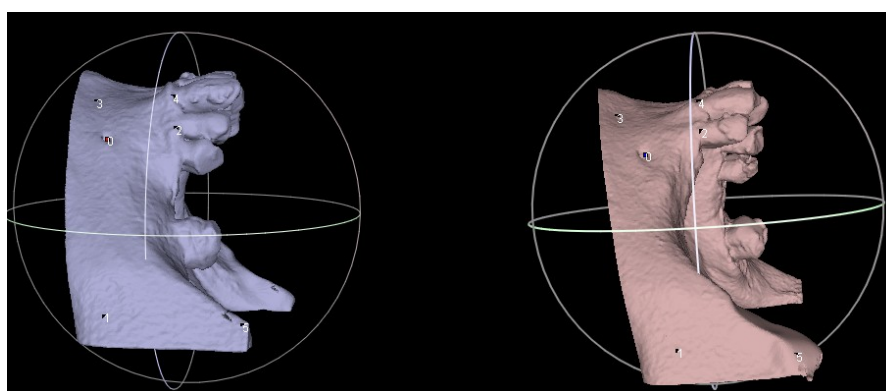


Figura 3.9: Allineamento Point Based Glueing

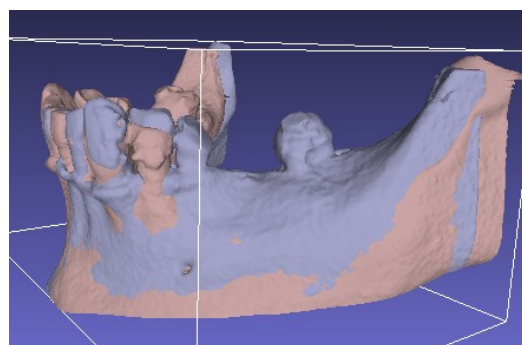


Figura 3.10: Risultato dell'allineamento

3.3.3 Sottrazione

La sottrazione tra la mandibola originale e quella specchiata è stata implementata in C++ e prevede le seguenti operazioni:

- conversione in formato binario della mandibola specchiata;
- creazione della immagine differenza: si vanno ad estrarre i valori di pixel corrispondenti delle immagini relative alla mandibola originale, indicato in seguito con `pixelvalue1`, e a quella specchiata, indicato in seguito con `pixelvalue2`: se il `pixelvalue1` è 255, il pixel dell'immagine differenza è sempre 0, in caso contrario (`pixelvalue1=0`), il pixel dell'immagine differenza è 0 se anche `pixelvalue2` è 0, altrimenti è 255;
- conversione e salvataggio della differenza in un file *.stl.

3.3.4 Finiture

Il risultato della sottrazione non sarà preciso: contiene parti che devono essere eliminate e devono essere rimossi i denti, ovviamente non presenti nel lato con il difetto e da non prendere in considerazione nella realizzazione dello stampo. Queste operazioni sono fatte con il software MeshMixer.

3.4 Creazione dello stampo

Sono state fatte varie versioni in risposta ai risultati che ottenuti dalle prove di laboratorio. La motivazione alle modifiche qui presentate sarà affrontata nel capitolo 4.

- Inizialmente l'idea era quella di costruire uno stampo rettangolare (Fig 3.11): per fare ciò è stata implementata una funzione in C++ che selezionava la zona intorno alla ricostruzione tridimensionale del difetto e ne faceva il negativo. Questo è realizzabile attraverso i seguenti passaggi:
 - Conversione del difetto in immagine binaria;

- Negativo dell'immagine: mette a 0 in pixel che erano ad 255 nell'immagine originale e viceversa;
- Conversione e salvataggio dell'immagine negativa in file *.stl.



Figura 3.11: Stampo: versione 1

- La seconda versione dello stampo (Fig. 3.12) prevedeva la sua realizzazione a strati alternati, dunque oltre alle operazioni elencate nel caso precedente, lo stampo veniva tagliato a strati sfruttando la versione base del programma Netfabb. A questo punto gli strati alterni venivano riuniti in un'unica mesh mediante una funzione scritta su C++ che prevede la conversione in immagine binaria dei singoli strati, la somma delle immagini e la conversione finale in mesh.

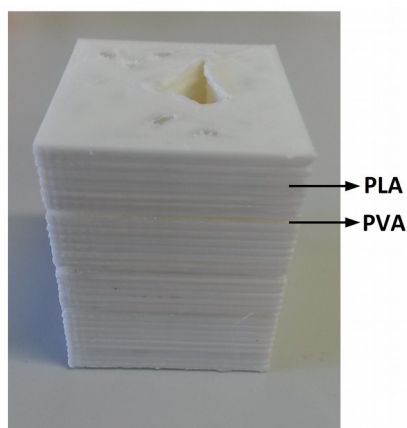


Figura 3.12: Stampo: versione 2

- L'ultima e definitiva versione dello stampo non è più di forma rettangolare ma è

una stampa della forma del difetto cava ed opportunamente ingrandita, per contrastare il ritiro volumetrico del polimero durante la solidificazione. Per fare ciò è stata implementata una funzione che prevede la trasformazione del difetto in immagine binaria e poi scorrendo sull'immagine quando trova l'inizio del volume (passaggio da 0 a 255) pone qualche pixel antecedenti a 255 (ad esempio 7 pixel se si vuole uno spessore di 0.7), quando trova la fine del volume (passaggio da 255 a 0) mette lo stesso numero di pixel successivi a 255. Gli altri pixel sono tutti 0. In questo modo è possibile ottenere stampi come quello mostrato in figura 3.13.



Figura 3.13: Stampo: versione 3

3.5 Pipeline MaDeRe

Con lo scopo di semplificare le operazioni e i passaggi tra i vari programmi è stata creata la pipeline MaDeRe (da Mandible Defects Reconstruction) mostrata in figura 22. Questa è stata realizzata utilizzando il programma Visual Studio in linguaggio C++ e per un utilizzo su sistema Windows.

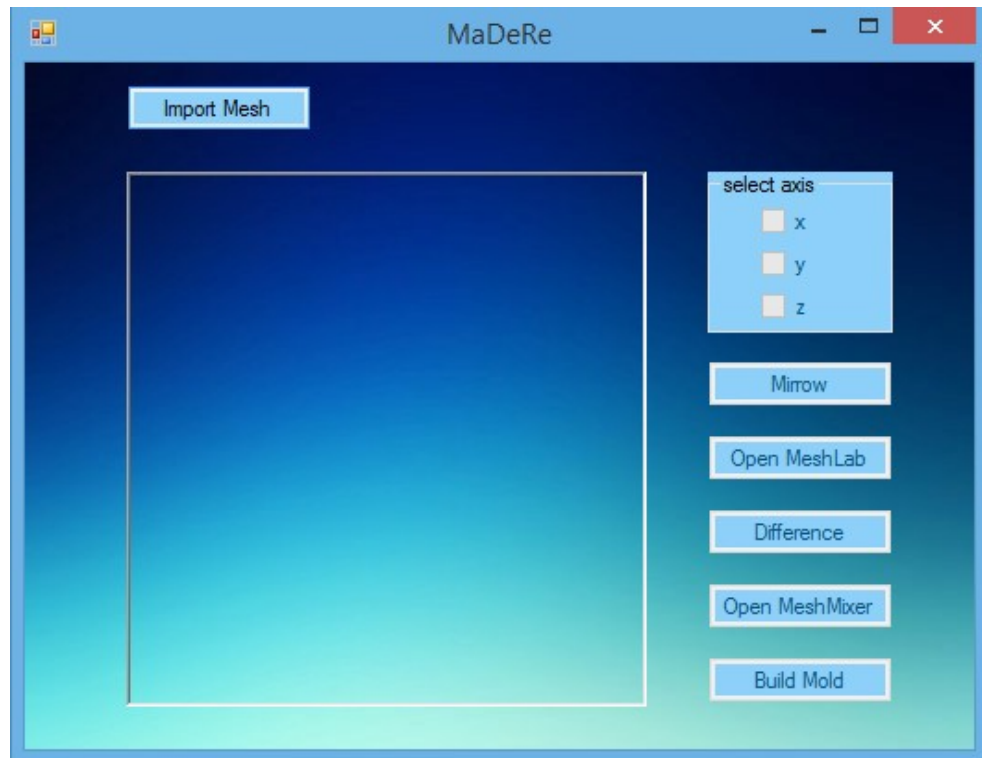


Figura 3.14: Pipeline Madere

Ne è riportata una breve descrizione:

- Tasto Import Mesh: permette di scegliere il file stl sul quale lavorare;
- Select Axis e Mirrow: nel check box deve essere scelto l'asse rispetto al quale fare la specchiatura; una volta selezionato l'asse, cliccando su Mirrow viene implementata l'operazione di specchio.
- OpenMesh Lab: con questo tasto si apre la mesh specchiata su MeshLab, questa può così essere allineata alla mesh originale sfruttando il tool Align di MeshLab.
- Difference: fa la differenza tra la mesh specchiata ed allineata e l'originale.
- Open MeshMixer: apre la differenza su MeshMixer, dove è possibile scartare le parti che esterne al difetto con tagli.
- Build Mold: Costruisce lo stampo virtuale.

3.6 Applicazione ad un caso clinico

In figura 3.15 è mostrata l'immagine tomografica dell'arcata inferiore della mandibola di un paziente. Il soggetto necessitava di un impianto dentale e il dentista ha valutato

necessaria la ricostruzione dell'osso mandibolare. Sono evidenziati in figura alcune delle viste in cui è possibile riconoscere il difetto.

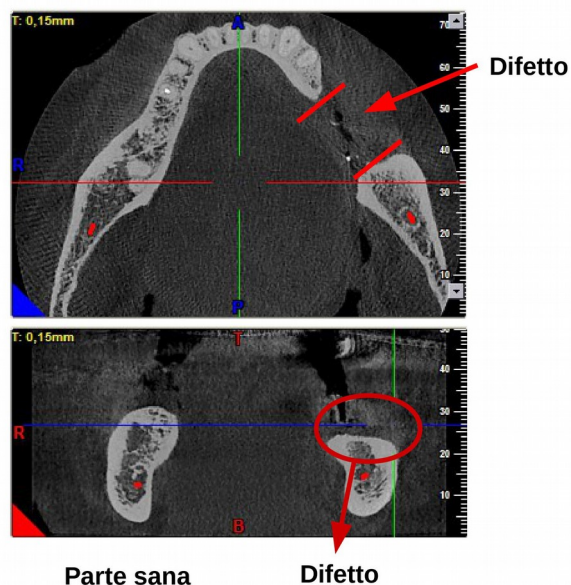


Figura 3.15: Immagine CT dell'arcata inferiore

L'immagine è stata segmentata con ITK-Snap seguendo la procedura prima descritta: in particolare si sceglie il metodo Region Competition e si va ad applicare una soglia inferiore del valore di 789: in figura 3.16 è mostrato l'istogramma dell'immagine con sovrapposta la soglia scelta (in rosso) e in figura 3.17 sono mostrate le tre viste dell'immagine dopo l'applicazione della sogliatura.

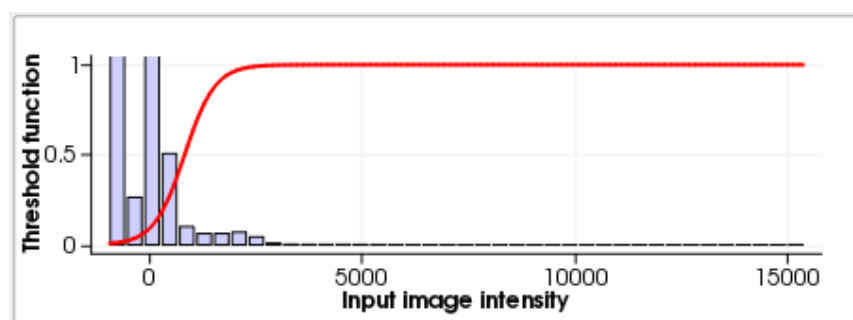


Figura 3.16: Istogramma dell'immagine

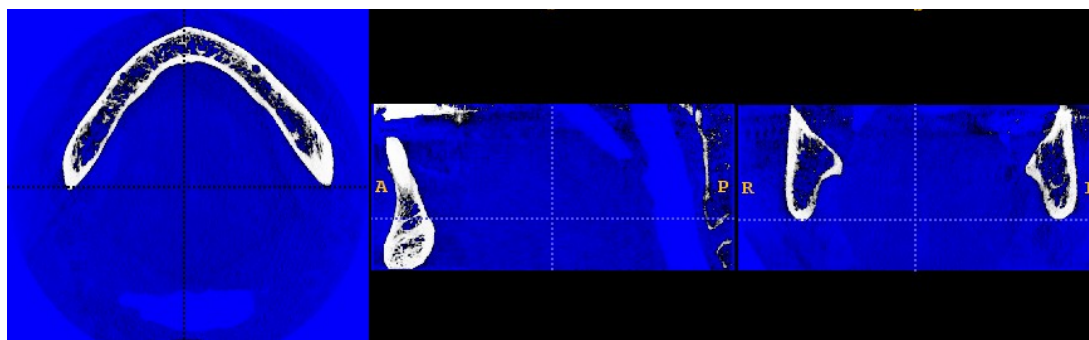


Figura 3.17: Immagine CT dopo l'applicazione della soglia

Sono stati messi 10 semi su varie slide, mentre i parametri della funzione di evoluzione del contorno sono lasciati quelli di default, ovvero Region competition force=1 e Smoothing (curvature) force=0.2.

Il processo di segmentazione semiautomatica ha impiegato circa 30 minuti, e alla fine di esso è stata necessaria una segmentazione manuale delle zone interne dell'osso (Fig. 3.18)

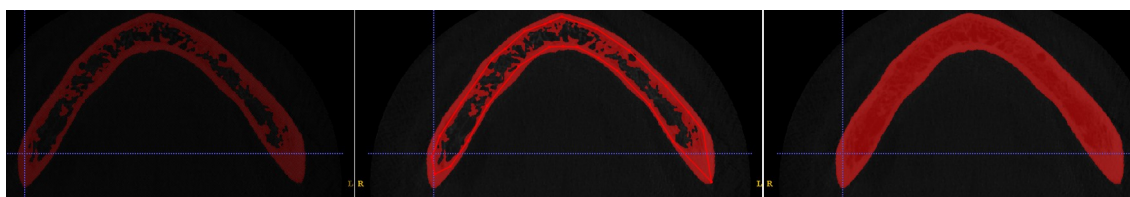


Figura 3.18: Segmentazione manuale

A questo punto è possibile ricostruire il modello 3D e salvarlo in formato stl. Questo è stato poi aperto con MeshLab per la lisciatura della superficie e la semplificazione illustrate prima. Inoltre, per ridurre ulteriormente la dimensione della mesh e per rendere il processo di stampa meno difficoltoso sono state tagliate le parti più esterne del modello, come il mento e i corni. Il risultato di tale operazione è riportato in figura 3.19. Nel modello è ben identificabile il difetto osseo.

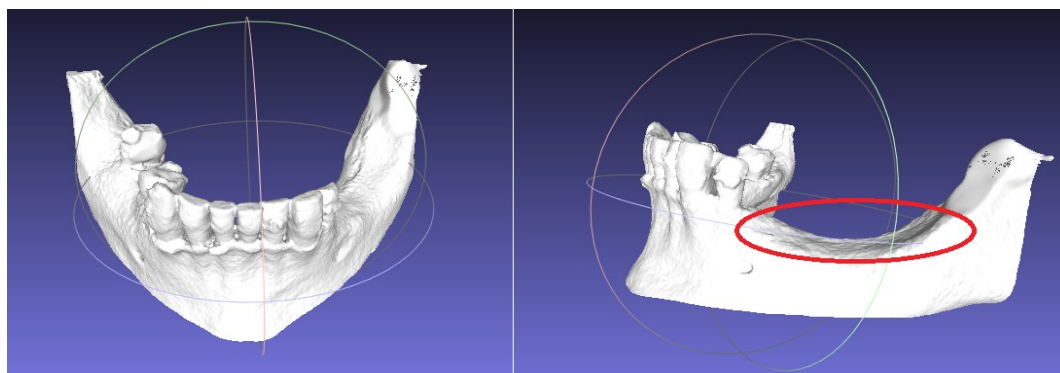


Figura 3.19: Modello 3D della mandibola del primo caso clinico

La mesh originale presentava 1034405 vertici e 2068832 triangoli, mentre dopo la semplificazione risultano 154928 vertici e 309824 triangoli: La riduzione è stata dell'85%.

I vari passi dell'algoritmo a specchio sono stati applicati ed il risultato è mostrato in figura 3.20.

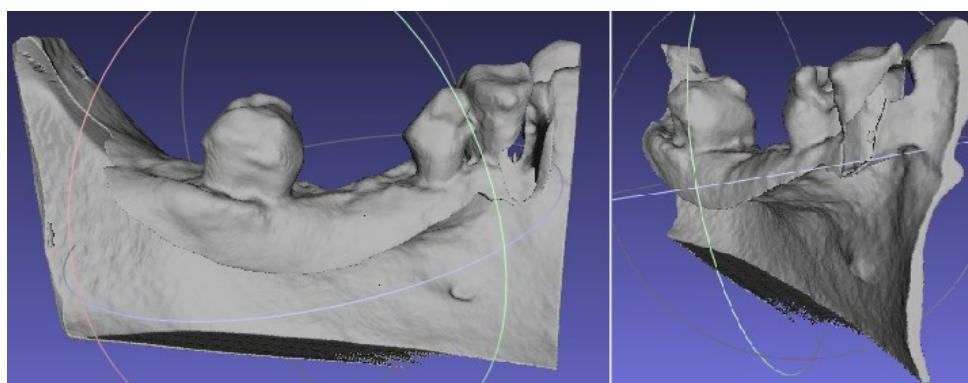


Figura 3.20: Differenza tra mandibola specchiata e originale

Questo modello deve essere ritagliato in modo opportuno e devono essere tolti i denti: per fare ciò è aperto insieme al modello della mandibola originale su MeshMixer. In questo modo è facilmente individuabile la zona d'interesse.

In figura 3.21 a e b, sono mostrati il modello della differenza (in bianco) e della mandibola (in grigio): ad una ispezione visuale si nota come la sovrapposizione sia buona. In figura 3.21c è mostrata un'operazione di taglio e in 3.21d il risultato finale.

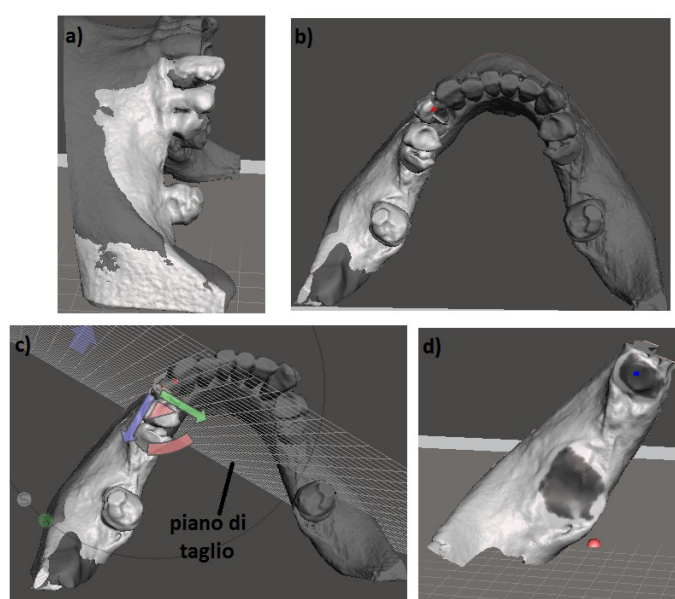


Figura 3.21: Operazioni di taglio e risultato finale

Attorno a questo modello sono state create le varie versioni di stampo: la versione 1.0 è di forma rettangolare e progettata per essere stampata completamente in PVA (Fig. 3.22a). Le prove su questo stampo, che verranno descritte nel paragrafo successivo, hanno evidenziato un ritiro dell'idrogel colato all'interno dello stampo in percentuali maggiori al 30%, poiché il PVA ne assorbe l'acqua.

Con il fine di limitare la quantità di PVA è stata proposta la versione 2.0: è di forma rettangolare e stampabile in strati alterni di PVA, in verde e PLA, in grigio (Fig. 3.22b). Questa presentava problemi legati all'estraibilità del pezzo interno dunque è stata ideata la versione 3.0: questa ha la forma del difetto e deve essere stampata interamente in PVA (Fig. 3.22c). In questo modo lo stampo si scioglie tutto ma la quantità di PVA è molto minore rispetto alla prima versione.

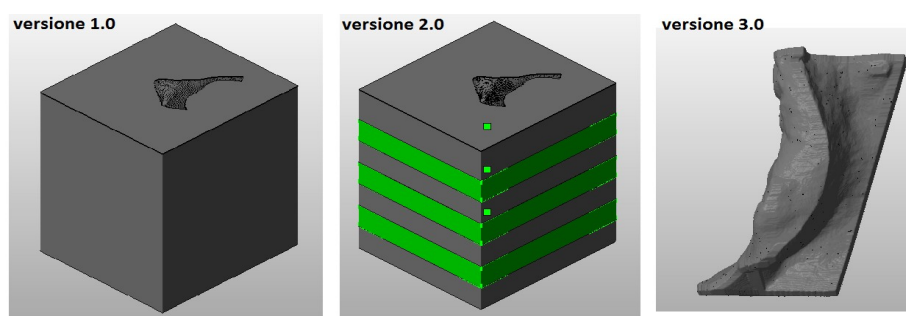


Figura 3.22: Le tre versioni di stampo

Le varie operazioni sono state effettuate in circa 3 ore, dove la fase più lenta è la segmentazione manuale necessaria dopo quella semiautomatica.

Bibliografia

- [1] "<http://www.itksnap.org/pmwiki/pmwiki.php>."
- [2] P. A. Yushkevich, J. Piven, C. Hazlett, G. Smith, S. Ho, J. C. Gee, and G. Gerig, "User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability," vol. 31, pp. 1116–1128, 2006.
- [3] L. Faggioni, F. Paolicchi, and E. Neri, *Elementi di Tomografia Computerizzata*. 2010.
- [4] "<http://meshlab.sourceforge.net/>."
- [5] A. Cohen, A. Laviv, P. Berman, R. Nashef, and J. Abu-Tair, "Mandibular reconstruction using stereolithographic 3-dimensional printing modeling technology," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 108, no. 5, pp. 661–666, 2009.
- [6] L. H. Li, K. P. Kommareddy, C. Pilz, C. R. Zhou, P. Fratzl, and I. Manjubala, "In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres.," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2525–2531, Jul. 2010.
- [7] "<http://www.meshmixer.com/>."
- [8] "<http://www.netfabb.com/>."
- [9] "<http://www.itk.org/>."
- [10] "<http://www.vtk.org/>."

4 Studi di fabbricazione

In questo capitolo sono descritte le procedure e i risultati della realizzazione fisica dello stampo e del sostituto osseo. Sono riportate successivamente le varie prove che hanno portato alla scelta della procedura finale.

4.1 Sostituto osseo: composizione, caratteristiche e sintesi

In questo lavoro è utilizzato come biomateriale un materiale composito. I compositi utilizzati come sostituti ossei presentano, come la matrice extracellulare del tessuto osseo, una fase inorganica e una fase organica. La fase organica è rappresentata da gelatina e la fase inorganica dall'idrossiapatite. È presente nel composto anche la genipina, con la funzioni di cross-linkante.

4.1.1 Gelatina

La gelatina è ampiamente utilizzata nel campo farmaceutico e biomedico. Essa è ottenuta dal collagene tramite processi di denaturazione termica o degradazione fisica e chimica, che prevedono la rottura della struttura a tripla elica. Il risultato è un prodotto biodegradabile biocompatibile e non immunogenico [1]. Le soluzioni acquose di gelatina alla temperatura di circa 40°C sono nello stato di sol e al raffreddamento formano gel fisicamente termoreversibili.

Durante la gelificazione le catene tendono ad una transizione dal disordine all'ordine e dunque tendono a ricostituire la struttura tripla elica del collagene [2]. Come biomateriale la gelatina è caratterizzata da diverse qualità: non mostra antigenicità, è completamente riassorbibile in vivo e le sue proprietà fisico-chimiche sono facilmente modulabili [3] [4]. Esistono due tipi di gelatina: il tipo A è prodotta per idrolisi acida dalla pelle di maiale; il tipo B per idrolisi alcalina delle ossa di bovino. I due tipi di gelatina si differenziano nel punto isoelettrico, nella loro viscosità intrinseca e nella loro capacità di formare film.

La gelatina utilizzata in questo lavoro è Gelatina di tipo A (Sigma Aldrich, Italia).

4.2.2 Idrossiapatite

L'idrossiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, simula la fase inorganica dell'osso: essa induce le cellule staminali mesenchimali a differenziarsi in osteoblasti [5]. Quando impiantato in vivo, questo materiale è non tossico, inattivo antigenicamente, non tumorigenico e si lega direttamente all'osso senza la formazione di un livello di tessuto connettivo. L'aggiunta di HA negli scaffold di gelatina ha dimostrato di migliorarne le proprietà meccaniche e l'attività e vitalità delle cellule osteoprogenitrici di ratto coltivate su essi [6]. Deve essere però tenuta presente l'esistenza di una soglia alla percentuale di HA da aggiungere oltre la quale la rugosità superficiale diventa inadatta alle cellule e HA passa da bioattiva a tossica. Le cellule mostrano una buona diffusione ed adesione fino al 47.5%, sono negativamente stimulate da percentuali sopra il 60%, fino ad inglobare lo stesso HA per percentuali oltre al 90% [7].

L'idrossiapatite utilizzata in questo lavoro di tesi è nanoXIM-HAp403 della Fluidinova.

4.1.3 Genipina

Il principale limite della gelatina per la preparazione di sostituti ossei è la sua rapida dissoluzione in ambienti acquosi, che causa una rapida degradazione dell'innesto alla temperatura corporea [8]. Per risolvere questo problema sono stati introdotti dei trattamenti di cross-linking. Esistono vari metodi di cross-linking, tra cui quello chimico, nel quale i cross-linker sono utilizzati per legare gruppi funzionali di amminoacidi. Gli agenti utilizzati comunemente, tra cui ad esempio la formaldeide e glutaraldeide, presentano una citotossicità relativamente alta, che causa una diminuzione della biocompatibilità del bioinnesto [9]. Per questa ragione sono stati cercati reagenti per il cross-linking che formano prodotti stabili e biocompatibili, senza causare problemi di citotossicità. Uno dei risultati della ricerca è stata la genipina, estratta dal frutto di *Gardenia Jasminoides* Ellis, che mostra un'azione protettiva contro danni ossidativi ed effetti citotossici, un'azione antinfiammatoria e fibrolitica [10].

La genipina mostra una bassa tossicità e forma prodotti crosslinkati biocompatibili con una resistenza alla degradazione enzimatica paragonabile a quella dei crosslinker sintetici.

E' di seguito riportato uno studio sulla velocità di degradazione di composti di gelatina e

varie concentrazioni di genipina [11], nel quale vengono valutate le perdite in peso dopo vari periodi di immersione. Le curve riportate in figura 4.1 possono essere divise in tre gruppi. Nel primo gruppo, la percentuale di perdita di peso per gelatina legata con lo 0,05% p/v di genipina decresce velocemente, fino ad arrivare al 100% dopo circa 42 giorni. Questo indica che genipina allo 0,05% p/v non è abbastanza per cross-linkare completamente la gelatina. Una più alta concentrazione di genipina, come ad esempio lo 0.1% p/v usata nel secondo gruppo, attenua significativamente la velocità di degradazione del composto. La curva corrispondente al terzo gruppo, che comprende concentrazioni di genipina tra lo 0,5% e l'1% p/v mostra una bassa velocità di degradazione e la miscela gelatina-genipina resiste fino ad 84 giorni.

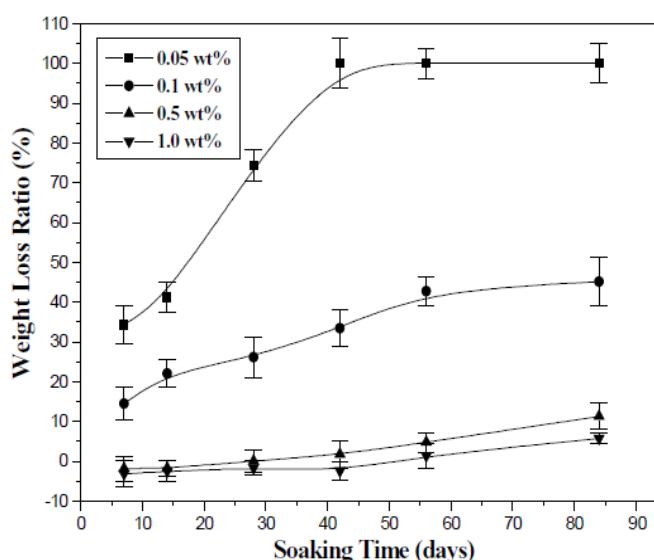


Figura 4.1: Effetto di diverse concentrazioni di genipina nella velocità di degradazione della gelatina cross-linkata con la genipina.

Altri studi, tra cui il lavoro di Sung[12], hanno valutato il vantaggio dell'utilizzo di genipina in termini di citotossicità, facendo test su fibroblasti 3T3 ed usando come controllo la glutaraldeide. Il risultato ottenuto mostra che la genipina è 10000 volte meno citotossica rispetto alla glutaraldeide ed inoltre la capacità proliferativa delle cellule dopo l'esposizione alla genipina è 5000 volte più grande rispetto a quella di cellule esposte alla glutaraldeide.

Un ulteriore vantaggio della genipina è la capacità di ridurre la risposta infiammatoria del tessuto ingegnerizzato dopo l'impianto [13].

In questo lavoro di tesi si utilizza la genipina prodotta da Challenge Bioproducts Co.

4.1.4 Reazione della genipina e gelatina

La genipina reagisce con materiali che contengono gruppi amminici primari, tra cui appunto la gelatina. I cross-link si formano attraverso una serie di reazioni che coinvolgono differenti siti della molecola della genipina e terminano con una polimerizzazione radicalica, che causa la formazione di un prodotto blu. Grazie alle reazioni radicaliche la genipina riesce a stabilire cross-link intermolecolari, a lunga e corta distanza, ed intramolecolari. Lo schema della reazione è riportato in figura 4.2: questa reazione avviene solo in presenza di ossigeno.

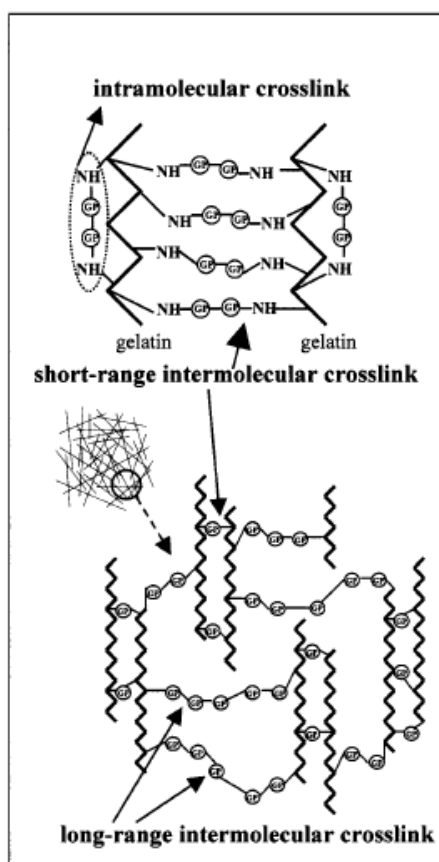


Figura 4.2: Reazione della Genipina con Gelatina

La reazione della genipina è piuttosto lenta a confronto degli altri crosslinker. Per stabilire la velocità della reazione è stato considerato come indice del progresso la formazione del pigmento blu e ciò suggerisce che dopo 48 ore la reazione con differenti concentrazioni di genipina può considerarsi conclusa. La velocità della reazione della genipina è favorita per concentrazioni superiori al 2.5%, ma dopo una valutazione del rilascio di genipina è stato notato che alte concentrazioni si rilevano tossiche per la

cellula. Per i sostituti ossei si utilizza dunque la concentrazione di 0.5%, che garantisce biocompatibilità. [7]

Un altro fattore che influenza la velocità della reazione è la temperatura. *Nickerson e collaboratori* [14] hanno valutato il tempo di gelificazione di campioni di gelatina contenenti differenti concentrazioni di genipina sottoposti a temperature comprese tra 25°C e 55°C come mostrato in figura 4.3: indipendentemente dalla concentrazione di genipina il tempo di gelificazione cresce fino a raggiungere un massimo, in corrispondenza di circa 45°C e dopo decresce velocemente.

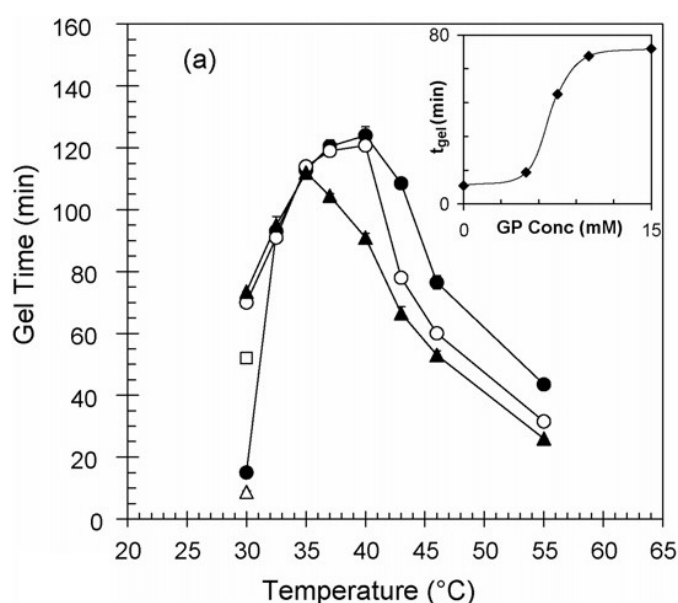


Figura 4.3: tempo di gelificazione

4.1.5 Caratterizzazione degli scaffold in gelatina e idrossiapatite

In uno lavoro proposto da *Jellin e collaboratori* [15] sono testati scaffold in gelatina, cross-linkata con genipina (0.5% p/v) ed idrossiapatite, in varie concentrazioni.

Il modulo di Young per varie concentrazioni di HA a 48 ore è mostrato in figura 4.4a: esso aumenta all'aumentare della concentrazione di HA. Stesse considerazioni possono essere fatte per i campioni testati dopo 10 giorni (Fig. 4.4b): si noti che un aumento del tempo comporta un irrigidimento generale delle strutture.

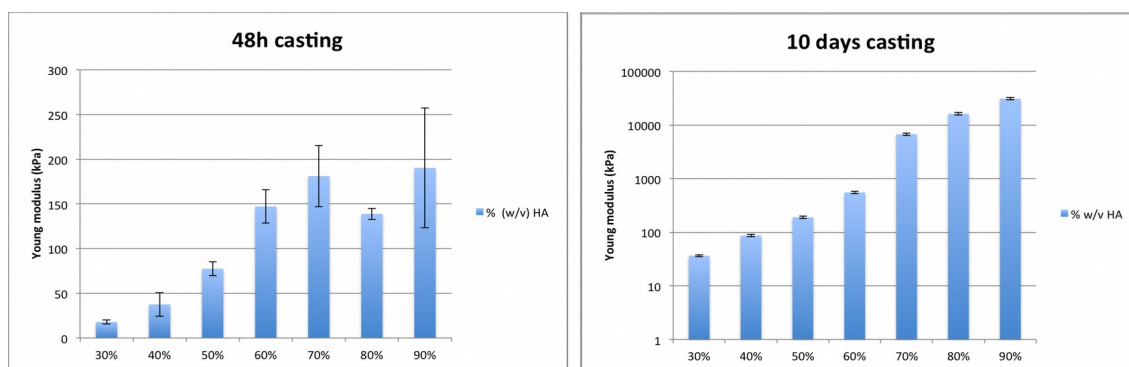


Figura 4.4: modulo di Young sui campioni testati dopo 48 ore (A) e 10 giorni (B).[7]

Immergendo i vari campioni in ambiente acquoso, essi presentano stabilità e non è stato osservato uno swelling apprezzabile.

Nel test di creep, i campioni testati mostrano un comportamento meccanico simile al modello di Kelvin. Si nota che i campioni hanno principalmente un comportamento di tipo elastico ed una bassa costante di viscosità e, di conseguenza, il loro tempo caratteristico di creep è corto (4.3 ± 0.5 secondi).

L'analisi SEM ha mostrato che i campioni presentano una struttura porosa con porosità che diminuisce all'aumentare di HA (Fig. 4.5). L'analisi EDX indica una distribuzione uniforme di calcio (70.28% p/p) e fosforo (26.78% p/p).

Tutti questi risultati rendono questi materiali utilizzabili come sostituti ossei.

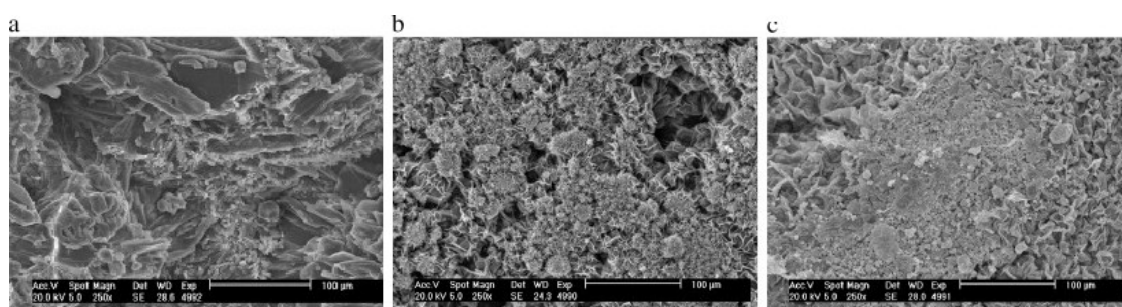


Figura 4.5: immagini SEM per campioni con HA in differenti percentuali: 40% p/v (a), 60% p/v (b) e 80% p/v (c)

4.16 Protocollo utilizzato

La gelatina utilizzata è gelatina di tipo A da pelle porcina; con questa si realizzano soluzioni al 5% p/v aggiungendo la gelatina a tampone fosfato salino (PBS), riscaldando e mescolando a 70°C su uno stirrer fino a quando il soluto non si sia disciolto (1 ora

circa). A questo punto si aggiunge il 30% p/v di idrossiapatite e lo 0.5% p/v di genipina, sempre mescolando e mantenendo ad una temperatura di circa 30°C. Dopo qualche minuto, la soluzione inizialmente bianca inizia a scurirsi: questo indica che la reazione è iniziata ed è necessario colare la soluzione nello stampo. Non si aspetta ulteriore tempo perché questo comporta un aumento della viscosità della soluzione e questo potrebbe causare un riempimento non completo dello stampo.

4.2 Strumentazione utilizzata

4.2.1 Stampante 3D e materiali

Per la realizzazione dello stampo è stata utilizzata la stampante 3Drag (Fig. 4.6).

La 3Drag è una stampante economica che sfrutta la tecnologia fused filament fabrication, in grado di stampare oggetti di dimensione massima di 20 x 20 x 20 centimetri [16]

La velocità tipica di stampa è di 120mm/sec circa, mentre la velocità massima varia a seconda dell'oggetto da stampare da 150 a 300 mm/sec. La risoluzione meccanica nominale è rispettivamente 0.015mm su X e Y e 0.39μm su Z. Il costo della stampante è inferiore a 1000 \$.

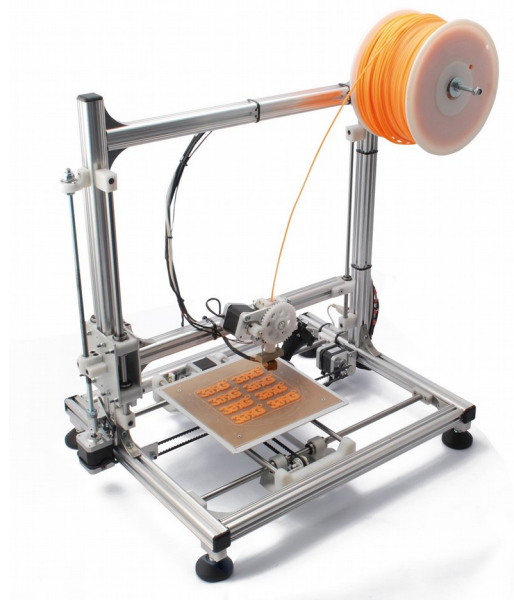


Figura 4.6: 3Drag

Per preparare il file STL alla stampa si utilizza il software Cura [17]. Alcuni tra i

parametri che devo essere definiti sono:

- Layer height: altezza del livello;
- Shell thickness: spessore del guscio esterno nella direzione orizzontale;
- Bottom/Top thickness: spessore della parte inferiore e superiore;
- Fill density: questo valore indica quanto densamente viene riempita la parte interna dell'oggetto in stampa.

I materiali utilizzabili in processi FDM, sotto forma di fili sottili avvolti in bobine, sono vari: si vanno ad elencare e descrivere brevemente quelli utilizzati in questo lavoro di tesi.

- ABS (dall'inglese Acrylonitrile Butadiene Styrene), si tratta di una termoplastica che resiste a temperature elevate prima di ammorbidirsi e perdere la sua resistenza meccanica e stabilità dimensionale, ma come difetto ha una temperatura di stampa elevata, 240°C circa. Durante il raffreddamento si riduce apprezzabilmente portando spesso alla deformazione dei primi strati stampati e al conseguente distacco dal piatto di stampa. Per evitare il fenomeno ci sono due strade, talvolta da usare in modo combinato: la prima strada è quella di avere un piatto trattato con un materiale che abbia forte adesione con l'ABS, mentre la seconda è quella di mantenere caldo il piano fra i 60°C e i 90°C [18];
- PLA (dall'inglese Polylactic acid), questo un è materiale “green”, in quanto creato elaborando la polpa di scarti vegetali ricchi di cellulosa; è preferito da molti rispetto all'ABS, anche se più fragile. Si rammollisce a temperature anche di soli 60°C e pertanto non può essere usato per creare parti meccaniche soggette ad usura e riscaldamento. Si stampa fra i 195°C e i 230°C a seconda degli additivi che sono stati aggiunti per colorarlo e modificarne le proprietà fisiche e meccaniche. Il ritiro volumetrico, rispetto all'ABS, è molto meno accentuato, anche grazie alla temperatura di estrusione un po' più bassa e alla sua struttura amorfa. [18];
- PVA (dall'inglese Polyvinyl Acetate) è un materiale da stampa solubile in acqua calda. Questa caratteristica lo rende adatto come materiale di supporto per strutture complesse in PLA o ABS. La sua temperatura di stampa è dai 180°C ai 220°C.

Il materiale utilizzato principalmente in questo lavoro di tesi è il PVA: in questo modo

lo stampo risulta solubile in acqua. Questo accorgimento di consente di costruire un unico blocco senza tener conto di eventuali sottosquadri: per togliere il pezzo è sufficiente metterlo in acqua calda. Non sarà dunque necessaria tutta la parte di design dello stampo, lavoro molto ingente anche per forme poco complesse. Inoltre la procedura di dissoluzione dello stampo necessita solo di immersione in acqua ed è molto rapida, dunque migliore rispetto ai trattamenti di pirolisi [19] o dissoluzione con solventi organici [20].

Il PVA, in quanto idrosolubile, è un materiale molto sensibile all'umidità: la presenza di gocce d'acqua all'interno del filamento rende difficoltosa e spesso compromette l'estrusione. E' stato necessario conservare la bobina in un ambiente fresco all'interno di un sacchetto insieme con gel di silice che ne assorbiva l'acqua. La velocità di stampa è non deve essere troppo lenta perché altrimenti il materiale tende a bruciarsi intasando l'estrusore, ma neanche troppo alta in quanto l'adesione al piano di stampa non è ottimale. Il PVA è stato estruso ad una temperatura di 210°C con velocità 30mm/sec.

4.2.2 Forno

Il forno da banco utilizzato è Digitheat di Selecta (Fig. 4.7). L'unità Digitheat è un forno di asciugatura e sterilizzazione, con controllo digitale. Questo forno ha un display per la visualizzazione della temperatura e del tempo. La temperatura può essere impostata tra 5°C e 250°C [21].



Figura 4.7: forno da banco

4.2.3 Forno ad UV

Si utilizza il forno CL-1000 Crosslinker dell'UVP (Fig. 4.8). Questo strumento permette di esporre i campioni ad una radiazione ultravioletta controllata, in modo rapido, sicuro

ed efficiente. È progettato per misurare e controllare la radiazione dentro la camera di esposizione: infatti un sensore di Ultravioletti misura continuamente l'energia degli UV e contrasta automaticamente le variazioni dell'intensità [22].



Figura 4.8: Forno ad UV

4.2.4 Liofilizzatore

La liofilizzazione è un processo che permette l'eliminazione dell'acqua da una sostanza, mediante surgelazione e sublimazione.

La liofilizzazione è stata fatta con BenchTop Pro della SP Scientific (Fig. 4.9). Questo permette di liofilizzare direttamente all'interno della campana in acrilico, su rack, prodotti sia sfusi che in vials o in bottiglie a bocca larga tramite rampe in acciaio. Ha inoltre un Controller Omnitronics basato su PLC con touch screen a colori e completa programmabilità della liofilizzazione con visualizzazione in real-time di tutti i parametri critici. È possibile controllarlo in remoto via ethernet. I pacchetti di refrigerazione sono a -55°C, -75°C, -85°C e -105°C. [23]



Figura 4.9: Liofilizzatore

4.3 Realizzazione dello stampo

Nel corso della realizzazione dello stampo sono state fatte 3 versioni successive di direttamente applicate a casi clinici. Su di esse sono stati valutati eventuali problemi e cercate le soluzioni che hanno portato alla realizzazione della versione definitiva e dunque della procedura da utilizzare.

4.3.1 Versione 1.0

Per le prime prove è stata utilizzata una mandibola che non presentava difetti e su di essa è stato creato un difetto osseo. Il primo stampo è stato realizzato totalmente in PVA con riempimento dello stampo al 25%. Lo stampo è congelato, dopo di che vi è stato colato il composto Gelatina in PBS al 5% p/v, Idrossiapatite al 30% p/v e Genipina al 0.5% p/v.

In figura 4 sono riportate immagini dello stampo vuoto (a), dopo 30 minuti (b), dopo 3 ore (c) e dopo 24 ore. Si nota come il polimero tenda a diventare da bianco a blu: questo indica il proseguirsi della reazione.

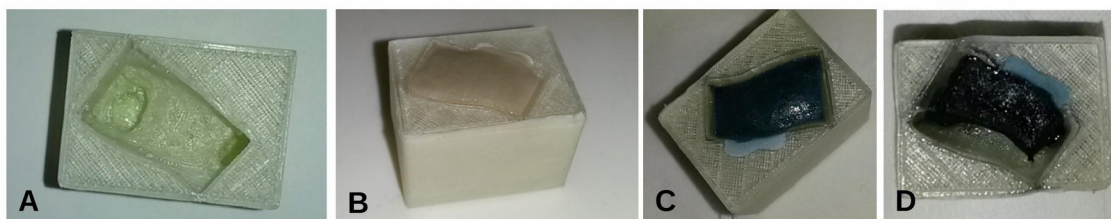


Figura 4.10: Foto del primo stampo vuoto (a) e dopo la colatura (b,c,d)

Dopo 48 ore, si nota che c'è stato un grande ritiro volumetrico dovuto all'assorbimento da parte del PVA dell'acqua contenuta nella gelatina. Per togliere il pezzo dallo stampo, è stato messo tutto in acqua a 60 gradi e dopo 25 minuti è stato possibile estrarlo facilmente.

Al fine di valutare l'entità del ritiro è stato confrontato il pezzo estratto con il modello tridimensionale del difetto stampato: con un calibro sono state misurate distanze corrispondenti su entrambi (Fig. 2) ed è stato calcolato un ritiro medio del 30%. Si nota però che la forma del pezzo estratto rispetta quella del difetto.



Figura 4.11: Confronto tra il pezzo estratto e il difetto stampato direttamente

Prove simili sono state fatte andando a modificare il coefficiente di riempimento: sono stati prodotti stampi con riempimento al 55% e al 10%. Andando a confrontare i pezzi da essi estratti con il difetto stampato non si notano particolari differenze rispetto allo stampo con riempimento al 25%.

4.3.2 Modifiche alla versione 1.0

Con il fine di ridurre il ritiro ed utilizzando degli stampi a forma cilindrica sono state fatte varie prove. Le prove differiscono per procedura e per tipo di materiale sia dello stampo sia del sostituto osseo.

Modifiche della procedura

La prima idea è stata quella di ricoprire le pareti interne dello stampo con policaprolattone (PCL) al 10% p/v in Cloroformio, in modo tale da renderle non permeabili. Questo si ottiene sciogliendo dei granuli di PCL in Cloroformio sullo stirrer a temperatura ambiente. Per rivestirli è stato utilizzato un pennello con il quale è stata ricoperta tutta la superficie interna del cilindro. Dopo una attesa di 15 minuti, in cui avviene l'evaporazione del solvente si crea un sottile film impermeabile.

In figura 4.12 sono confrontati i ritiri sulla faccia inferiore, superiore e in altezza nel caso di stampi non rivestiti (in nero) e rivestiti (in grigio).

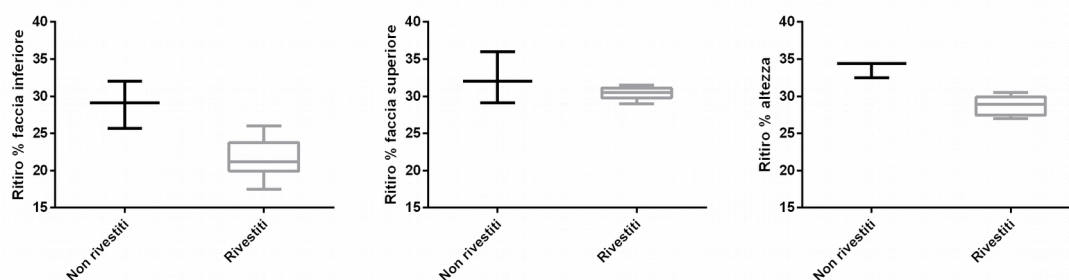


Figura 4.12: Confronto dei ritiri volumetrici tra campioni rivestiti in PCL e non, calcolati sulla faccia inferiore, sulla faccia superiore e in altezza.

Si nota che il rivestimento causa una leggera diminuzione del ritiro su tutte e tre le dimensioni ma il risultato non è ancora soddisfacente. Inoltre, considerando forme dello stampo più complesse rispetto al cilindro il rivestimento interno sarebbe difficile da fare.

L'idea successiva è stata quella di mettere gli stampi dopo la colatura in forno, con l'idea di velocizzare la reazione tra genipina e gelatina. Gli stampi sono tenuti in forno a 60°C per 40 minuti; la prova è stata fatta anche su alcuni campioni rivestiti in PCL. In figura 4.13 sono riportati i risultati, confrontati con il ritiro calcolato sui campioni non rivestiti della prova precedente che sono utilizzati nelle prove successive come controllo.

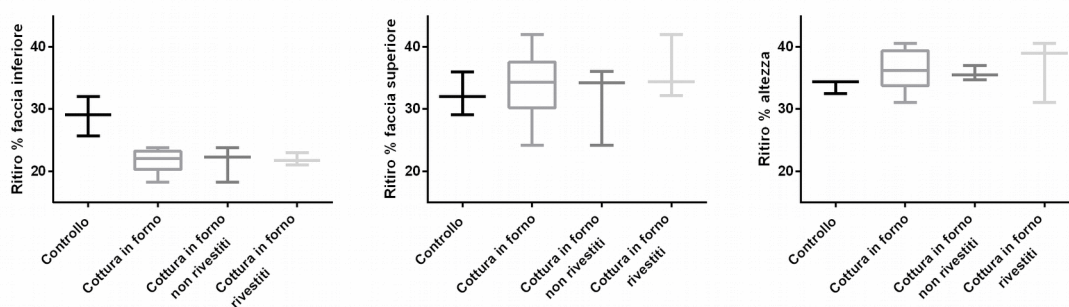


Figura 4.13: Confronto dei ritiri volumetrici tra i campioni di controllo e quelli sottoposti alla cottura in forno, calcolati sulla faccia inferiore, sulla faccia superiore e in altezza.

Si nota che c'è una diminuzione del ritiro sulla faccia inferiore sia nel caso di campioni rivestiti che non, mentre sulle altre dimensioni il ritiro è addirittura maggiore rispetto al campione di controllo.

Altri campioni sono stati messi in forno ad ultravioletti per 10 minuti, sempre con lo scopo di velocizzare la reazione. I risultati sono proposti in figura 4.14.

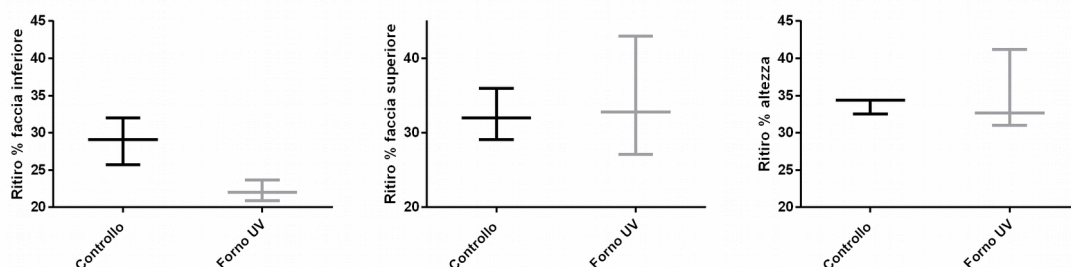


Figura 4.14: Confronto dei ritiri volumetrici tra campioni di controllo e quelli sottoposti ai raggi UV calcolati sulla faccia inferiore, sulla faccia superiore e in altezza.

Come nel caso precedente la diminuzione del ritiro è solo sulla faccia inferiore, mentre vi è un aumento sulle altre.

Modifica del polimero

Dati gli scarsi risultati, è nata l'idea di fare delle prove andando a modificare la composizione del polimero, ed in particolare di utilizzare come cross-linker il glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS) al posto della genipina. In questo caso la reazione si completa solo in assenza di acqua, dunque è stato necessario un trattamento di liofilizzazione. Con questo polimero sono state effettuate due tipi di procedure: la prima consiste nel congelamento degli stampi e trattamento di liofilizzazione della durata di 12 ore, mentre il secondo prevedeva anche una successiva fase in cui gli stampi erano tenuti su piastra a 37°C per 24 ore. In figura 4.15 sono riportati i risultati.

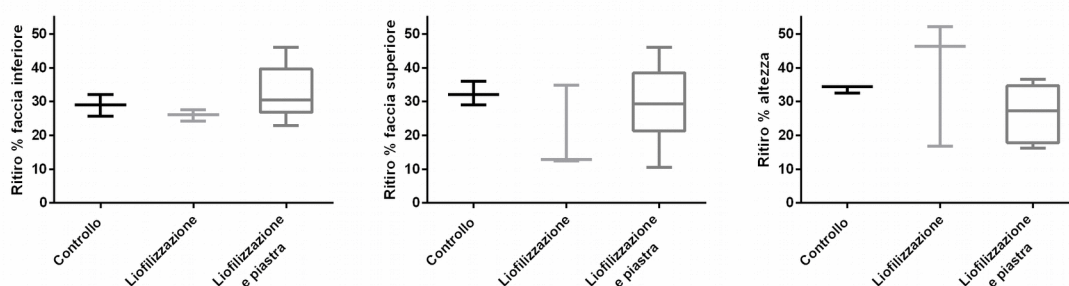


Figura 4.15: Confronto dei ritiri volumetrici tra campioni di controllo e quelli con GPTMS, calcolati sulla faccia inferiore, sulla faccia superiore e in altezza.

Non si nota un miglioramento del ritiro, anzi alcuni campioni si comportano in modo peggiore rispetto al controllo.

Modifiche allo stampo

Dati gli ingenti ritiri volumetrici riscontrati nella realizzazione di stampi in PVA, a causa dell'assorbimento di acqua del polimero da parte dello stampo, sono stati realizzati stampi in PLA con strati di PVA che continuano a consentire l'apertura dello stampo in acqua.

Sono state prodotte inizialmente 3 tipologie di stampo:

- totalmente in PLA (in tabella indicato con PLA);
- singolo strato di PVA (in tabella indicato con 1PVA);
- doppio strato di PVA (in tabella indicato con 2PVA);

In figura 4.16 sono riportati i valori medi dei ritiri in altezza, diametro della faccia superiore e inferiore. Già da questa prima prova è risultato che i ritiri fino ad ora riscontrati rimanevano presenti, anche se in diminuiti.

Questo potrebbe essere dovuto al fatto che anche il PLA assorba l'acqua del polimero: come controprova è stato utilizzato per la realizzazione dello stampo un materiale differente (ABS), ma anche in questo caso il polimero si ritirava.

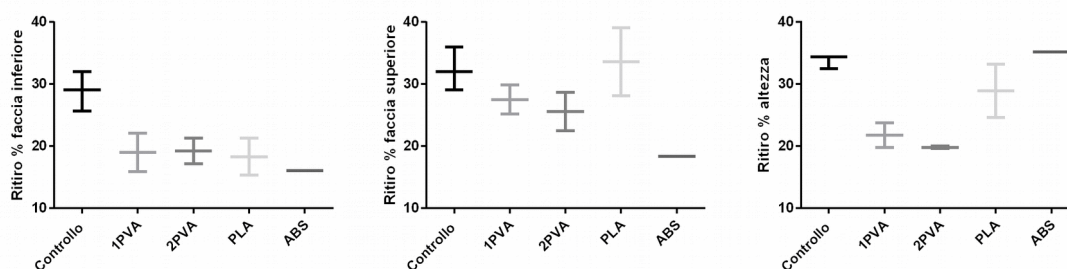


Figura 4.16: Confronto dei ritiri volumetrici tra campioni di controllo e quelli estratti da stampi di materiali differenti, calcolati sulla faccia inferiore, sulla faccia superiore e in altezza.

E' stato ipotizzato allora che l'acqua venisse principalmente persa per evaporazione dallo strato scoperto. Per verificare questa ipotesi gli stampi sono stati chiusi con una membrana permeabile all'ossigeno, necessario per la reazione di polimerizzazione, ma impermeabile all'acqua: il parafilm. Per evitare che il polimero ancora liquido esca dallo

stampo durante l'applicazione del parafilm, esso è precedentemente congelato fino alla solidificazione (15 minuti circa).

La procedura è stata fatta su stampi totalmente in PLA e ABS, e su stampi con strati alternati di PVA e PLA (Fig. 4.17 e 4.18).

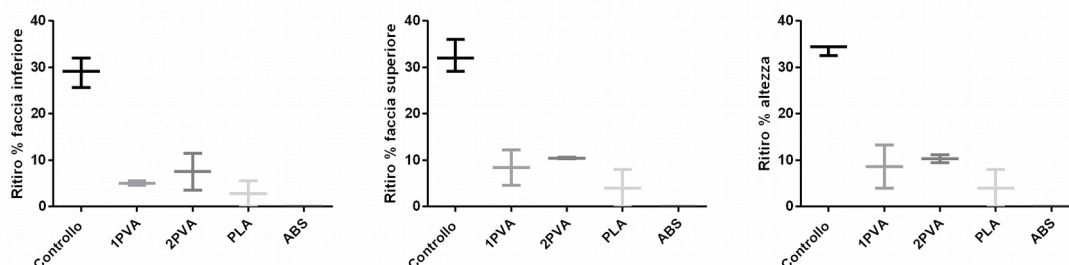


Figura 4.17: Confronto dei ritiri volumetrici tra campioni di controllo e quelli estratti da stampi di materiali differenti coperti da parafilm, calcolati sulla faccia inferiore, sulla faccia superiore e in altezza.

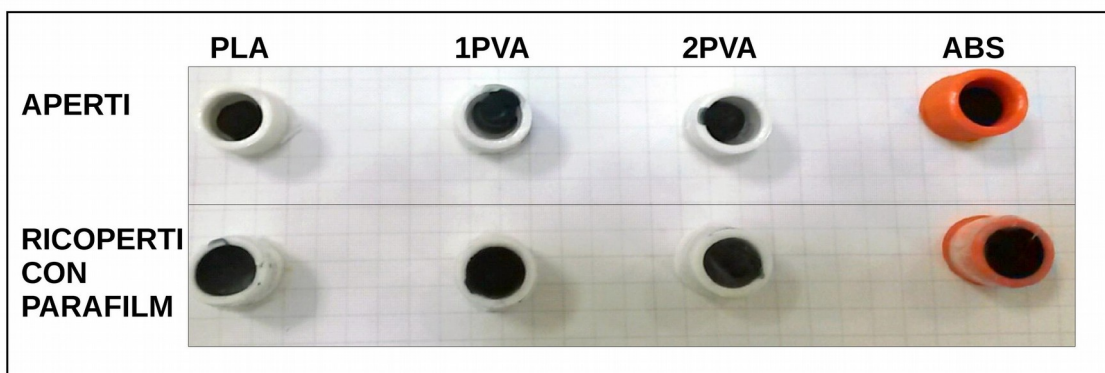


Figura 4.18: Confronto tra campioni con e senza rivestimento

In questo caso il ritiro è stato pressoché nullo nel caso di stampi realizzati totalmente in PLA e ABS, e molto ridotto nel caso di stampi con strati di PVA. Una volta tolto lo stampo, i campioni erano sempre morbidi e si notavano sul fondo delle zone più chiare in cui la reazione non si è completata del tutto (Fig. 4.19): questo è dovuto al fatto che nonostante il parafilm sia permeabile all'ossigeno la sua diffusione è rallentata.

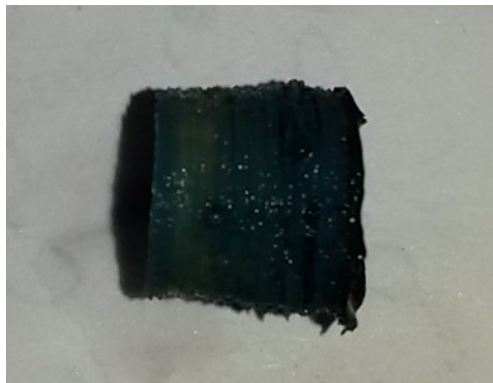


Figura 4.19: Campione estratto da uno stampo coperto con parafilm

Dopo qualche ora fuori dallo stampo la reazione si conclude, come dimostrato dal fatto che il campione diventa tutto blu. Questo risultato è soddisfacente e la procedura è stata applicata su uno stampo del difetto mandibolare vero e proprio.

4.3.3 Versione 2.0

La procedura è:

1. realizzare stampi in PLA con piccoli strati di PVA;
2. utilizzare il composto Gelatina al 5% p/v, Idrossiapatite al 30% p/v e Genipina al 0,5% p/v;
3. mettere in congelatore fino a che il composto non si sia solidificato;
4. coprire con parafilm;
5. attendere 48 ore.

Sono state realizzate due tipologie di stampo, rispettivamente con strati di PVA orizzontali e verticali rispetto al difetto (Fig. 4.20).



Figura 4.20: Stampi in PLA con strati di PVA orizzontali e verticali

Al momento dell'apertura gli stampi sono stati immersi in acqua calda per pochi minuti. Si nota che i pezzi hanno un ritiro non visibile ad occhio, ma durante l'estrazione del pezzo dallo stampo si è verificata la sua rottura in alcuni punti, particolarmente in corrispondenza di spessori sottili, come si nota in figura 4.21.

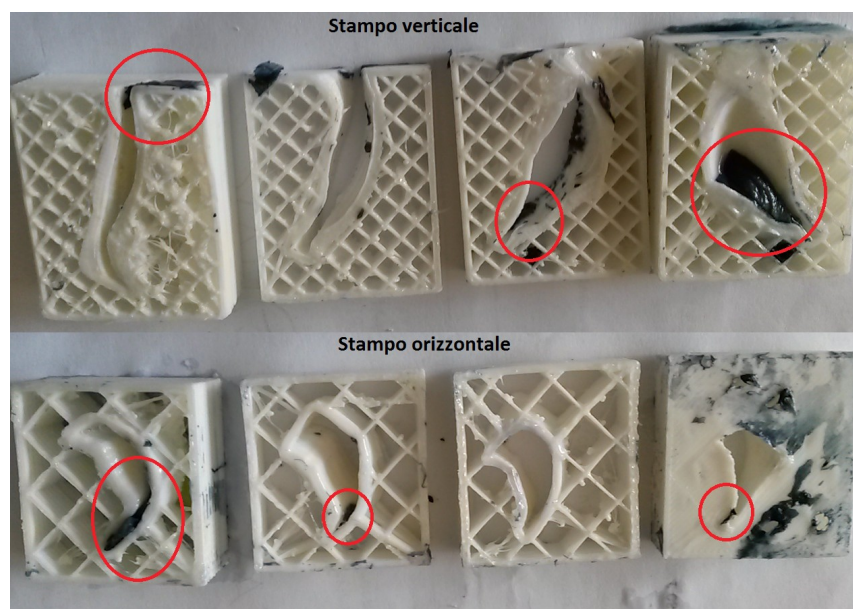


Figura 4.21: Apertura degli stampi

A dimostrazione che la forma era quella adatta e che il ritiro non andava a compromettere il combaciare tra il pezzo e il difetto, è stata stampata la mandibola ed è stato provato il pezzo su di essa. Il risultato come si nota da figura 10 può dirsi soddisfacente.



Figura 4.22: Applicazione del campione sulla mandibola con difetto

4.3.4 Modifiche alla versione 2.0

Per risolvere il problema dell'estrazione del pezzo dallo stampo, inizialmente si è pensato di utilizzare un tool di Solidwork che permette di calcolare il piano in cui porre

l'apertura dello stampo evitando la presenza di sottosquadri. Data la complessità della forma del pezzo e la dimensione della mesh questo metodo non si è rivelato efficace.

A questo punto è stato necessario ritornare alla prima idea di stampo interamente realizzato in PVA. La nuova proposta è stata quella di limitare al minimo la dimensione dello stampo: si passa da stampi di forma rettangolare a stampi fatti della stessa forma del difetto con uno spessore di 0.7 mm. Altro accorgimento è stato quello di limitare il tempo in cui il polimero è dentro allo stampo.

A questo scopo sono state fatte nuovamente delle prove su stampi cilindrici con tempi di attesa di 4 e 2 ore. Nonostante la reazione del polimero non sia completata dopo 4 o 2 ore, quando gli stampi sono messi in acqua esso non tende a sciogliersi anzi, la reazione si completa. (Fig. 4.23)

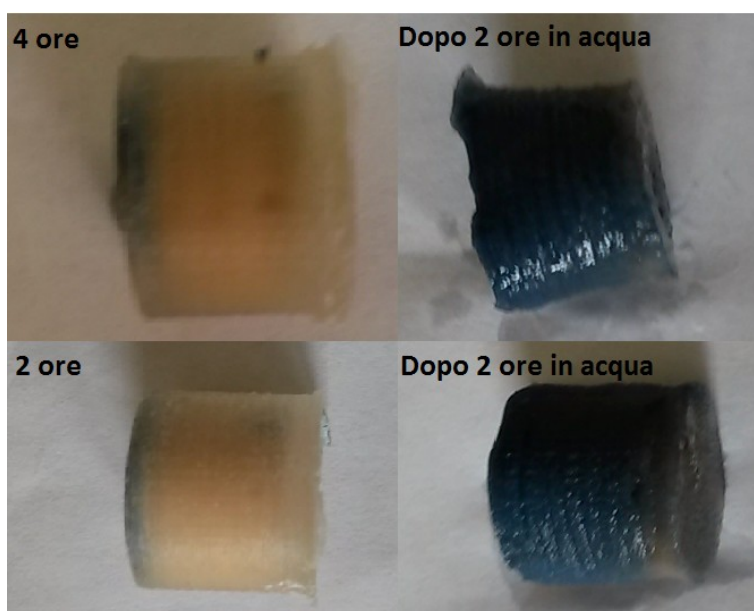


Figura 4.23: Estrazione del campione dopo 4 e 2 ore

Il ritiro finale dei campioni cilindrici calcolato su faccia superiore, inferiore ed altezza è minore del 1%.

4.3.5 Versione 3.0

Dati i risultati precedenti è stata proposta la seguente procedura:

1. realizzazione dello stampo come forma cava del difetto con spessore di 0,7 mm opportunamente scalata per compensare il ritiro volumetrico (Fig. 4.24);
2. preparazione e colatura del composto gelatina, genipina ed idrossiapatite;
3. conservazione in congelatore fino alla solidificazione del composto;

4. copertura con parafilm per limitare l'evaporazione, ed attesa di circa 2 ore per la polimerizzazione iniziale;
5. dissoluzione dello stampo in acqua calda (40°C) in agitazione per circa 1 ora.

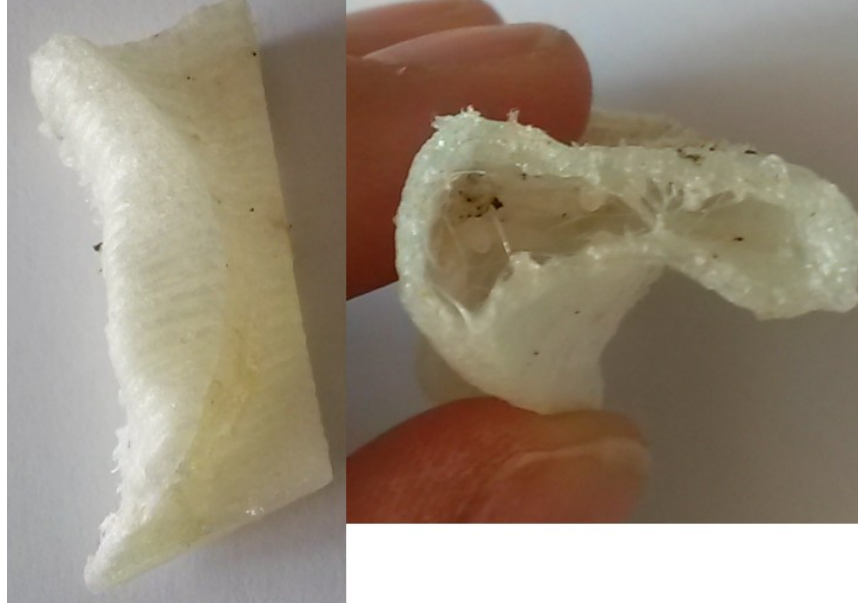


Figura 4.24: Stampo terza versione

Il risultato di questa prova è stato confrontato con il difetto stampato direttamente in PLA (Fig. 4.25) e il ritiro è stato uniforme su tutte le dimensioni e del valore medio di 0.8%.



Figura 4.25: Confronto tra il campione estratto e il difetto direttamente stampato

Andando a realizzare uno stampo considerando con dimensioni maggiorate dello 0.8% rispetto a quelle calcolate, si ottiene un risultato del tutto conforme con il difetto mandibolare. (Fig 4.26 e 4.27)



Figura 4.26: Confronto tra il campione dopo la scalatura di +0.8% e il difetto direttamente stampato



Figura 4.27: Campione posto sul difetto mandibolare

Bibliografia

- [1] B. N. O. C. M. G. K. J. Rose PJ, Mark HF, *Encyclopedia of polymer science and engineering*. .
- [2] L. J. Pezron I, Djabourov M, *Polymer*. .
- [3] S. Fakirov, Z. Sarac, T. Anbar, B. Boz, I. Bahar, M. Evstatiev, a. a. Apostolov, J. E. Mark, and a. Kloczkowski, "Mechanical properties and transition temperatures of cross-linked oriented gelatin," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 274, no. 4, pp. 334–341, 1996.
- [4] F. H. Lin, C. H. Yao, J. S. Sun, H. C. Liu, and C. W. Huang, "Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin.," *Biomaterials*, vol. 19, no. 10, pp. 905–917, May 1998.
- [5] H. Yuan, K. Kurashina, J. D. de Bruijn, Y. Li, K. de Groot, and X. Zhang, "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics.," *Biomaterials*, vol. 20, no. 19, pp. 1799–1806, Oct. 1999.
- [6] G.-C. Dong, H. M. Chen, and C.-H. Yao, "A novel bone substitute composite composed of tricalcium phosphate, gelatin and drynaria fortunei herbal extract.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 84, no. 1, pp. 167–177, Jan. 2008.
- [7] F. Montemurro, "Realization and characterization of bioactive composite materials for locomotor tissue regeneration."
- [8] C. Michon, G. Cuvelier, P. Relkin, and B. Launay, "Influence of thermal history on the stability of gelatin gels.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 20, no. 4, pp. 259–264, Jul. 1997.
- [9] J. M. Lohre, L. Baclig, J. Sagartz, S. Guida, K. Thyagarajan, and R. Tu, "Evaluation of two epoxy ether compounds for biocompatible potential.," *Artif. Organs*, vol. 16, no. 6, pp. 630–633, Dec. 1992.
- [10] T. H. Tseng, C. Y. Chu, J. M. Huang, S. J. Shiow, and C. J. Wang, "Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes.," *Cancer Lett.*, vol. 97, no. 1, pp. 61–67, Oct. 1995.
- [11] C.-H. Yao, B.-S. Liu, C.-J. Chang, S.-H. Hsu, and Y.-S. Chen, "Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 83, no. 2–3, pp. 204–208, Feb. 2004.
- [12] H. W. Sung, R. N. Huang, L. L. Huang, and C. C. Tsai, "In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue

- fixation.,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 1, pp. 63–78, 1999.
- [13] E. G. Lima, A. R. Tan, T. Tai, K. G. Marra, A. DeFail, G. A. Ateshian, and C. T. Hung, “Genipin enhances the mechanical properties of tissue-engineered cartilage and protects against inflammatory degradation when used as a medium supplement.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 91, no. 3, pp. 692–700, Dec. 2009.
- [14] M. T. Nickerson, J. Patel, D. V. Heyd, D. Rousseau, and a. T. Paulson, “Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 39, no. 4–5, pp. 298–302, 2006.
- [15] C. Jelen, G. Mattei, F. Montemurro, C. De Maria, M. Mattioli-Belmonte, and G. Vozzi, “Bone scaffolds with homogeneous and discrete gradient mechanical properties.,” *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 1, pp. 28–36, Jan. 2013.
- [16] “<http://3dprint.elettronica.it/>.” .
- [17] “<https://ultimaker.com/en/products/cura-software>.” .
- [18] H. Saechtlinh, *Manuale delle materie plastiche*. 2006.
- [19] T. M. G. Chu, J. W. Halloran, S. J. Hollister, and S. E. Feinberg, “Hydroxyapatite implants with designed internal architecture,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 6, pp. 471–478, 2001.
- [20] E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, and J. T. Czernuszka, “Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication.,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1487–1497, Apr. 2003.
- [21] “<http://www.grupo-selecta.com/>.” .
- [22] “<http://uvp.com/crosslinker.html>.” .
- [23] “<http://www.spscientific.com/>.” .

Conclusioni e sviluppi futuri

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di definire una procedura per la realizzazione di un innesto sintetico da impiantare a pazienti che presentano difetti a livello mandibolare: l'innesto doveva avere forma coincidente con quella del difetto e la procedura non doveva essere costosa, in quanto non si vuole andare ad incidere eccessivamente sul costo del trattamento.

Nel presente lavoro di tesi è stato adottato il metodo della prototipazione rapida indiretta, che prevede la realizzazione di uno stampo la cui cavità coincide con la forma del difetto, dentro il quale verrà colato il materiale scelto come sostituto osseo [1]. L'innovazione proposta è stata quella di utilizzare un materiale idrosolubile in modo da garantire una semplice estrazione del pezzo della stampo, semplicemente immergendo il tutto in acqua. In questo modo è facilitata anche la fase di progettazione, non dovendo, ad esempio, garantire l'assenza di sottosquadri. Tra le varie tecniche a disposizione è stata utilizzata una tecnologia open source Fused Deposition Modelling, con il PVA come materiale di stampa.

Il lavoro ha previsto l'analisi dell'intera procedura, dall'estrazione delle informazioni dalle bioimmagini alla fabbricazione dell'innesto.

L'estrazione delle informazioni può essere suddivisa nelle seguenti fasi di lavoro:

1. costruzione del modello tridimensionale della mandibola: si è sfruttato il programma di segmentazione ITK-Snap;
2. identificazione del volume del difetto: dopo una ricerca dello stato dell'arte si è deciso di replicare la funzione `mirrow` proposta da alcuni software commerciali [2] e [3], nei quali la parte intatta della mandibola viene “specchiata” per interpolare il volume del difetto;
3. progettazione e design dello stampo.

Questi passaggi sono effettuati sfruttando solo software open source oppure attraverso l'implementazione di apposite funzioni scritte in linguaggio C++.

Lo stampo è stato fabbricato mediante tecnologia Fused Deposition Modelling.

La parte di testing è iniziata con la scelta e caratterizzazione del materiale da utilizzare come sostituto osseo. Tra i vari biomateriali già utilizzati nel campo di ingegneria tessutale dell'osso è stato scelto per questo lavoro di tesi un materiale composito con

fase inorganica rappresentata dall'idrossiapatite e fase organica rappresentata dalla gelatina. La genipina, un composto di origine naturale, è usata con funzione di cross-linkante, per garantire la stabilità della gelatina in ambienti acquosi. La composizione è la seguente: gelatina di tipo A in PBS al 5% p/v, idrossiapatite al 30% p/v e genipina al 0,5% p/v. Una volta scelto, il materiale è colato all'interno dello stampo: il problema principale è stato il grande ritiro volumetrico (superiore al 30%) presentato dal polimero, dovuto all'assorbimento da parte del PVA dell'acqua contenuta nella gelatina. Successive prove sono state effettuate su stampi di dimensioni dell'ordine del cm, di vari spessori e forme, e hanno guidato il design dello stampo e la procedura di preparazione verso la soluzione definitiva:

1. realizzazione dello stampo come forma cava del difetto con spessore di 0,7 mm opportunamente scalata per compensare il ritiro volumetrico;
2. preparazione e colatura del composto gelatina, genipina ed idrossiapatite;
3. conservazione in congelatore fino alla solidificazione del composto;
4. copertura con parafilm per limitare l'evaporazione, ed attesa di circa 2 ore per la polimerizzazione iniziale;
5. dissoluzione dello stampo in acqua calda (40°C) in agitazione per circa 1 ora.

Questa procedura è stata applicata ad un caso clinico, il risultato è mostrato in figura C.1, dove nella foto a sinistra è riportato il modello della mandibola, dove è ben visibile il difetto, mentre nell'immagine di destra il sostituto osseo è sovrapposto al difetto.

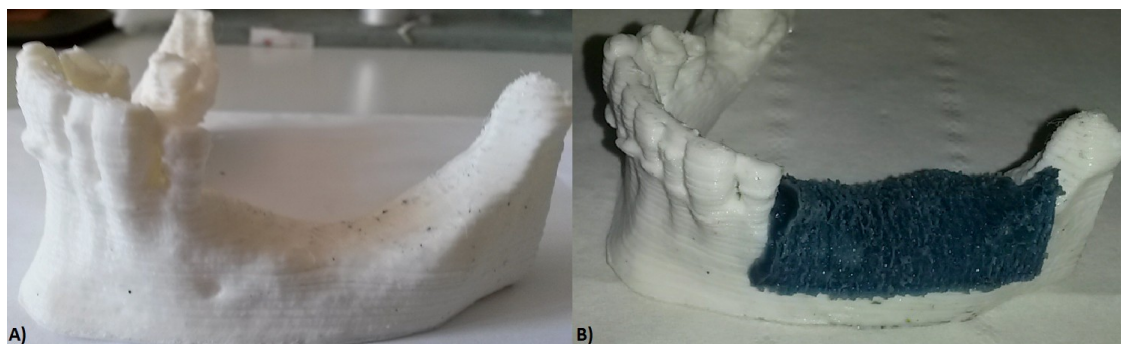


Figura C.1: modello della mandibola presentante il difetto (a) e sovrapposizione dell'innesto al modello (b).

Ad una ispezione visuale si nota come lo scopo sia stato soddisfacentemente raggiunto. Il risultato è quindi una ricostruzione di un difetto osseo in maniera con una procedura molto economica: infatti, durante l'elaborazione non si fa utilizzo di alcun software commerciale, la realizzazione dello stampo è fatta sfruttando una macchina da

produzione additiva di fascia economica e la procedura non richiede l'uso di strumentazione costosa, ma solo di stirrer e congelatore.

Altra introduzione che ha portato molti vantaggi è legata all'utilizzo del PVA per produrre lo stampo: in questo modo è stato possibile evitare tutti i problemi legati alla progettazione di stampi ad estrazione meccanica. Inoltre, la procedura di dissoluzione dello stampo necessita solo di immersione in acqua ed è molto rapida (circa 1 ora), dunque migliore rispetto ai trattamenti di pirolisi [4] o dissoluzione con solventi organici [5].

L'utilizzo di genipina come cross-linkante della gelatina nel composto utilizzato come sostituto osseo, ha dato ottimi risultati di stabilità dei campioni ed è preferita rispetto a cross-linkanti utilizzati comunemente, come la formaldeide e glutaraldeide, che presentano una citotossicità relativamente alta, con una conseguente diminuzione della biocompatibilità del bioinnesto [6].

Vari aspetti della procedura necessitano di ulteriori studi e modifiche:

- ottimizzazione del software per diminuire i tempi computazionali;
- valutazione l'accuratezza e risoluzione della procedura mediante scansione 3D dell'innesto finale. Un'analisi preliminare è stata fatta con scansione tramite foto, utilizzando il programma 123D Catch di Autodesk;
- studi sulla purezza dell'oggetto finale per verificare che non abbia assorbito qualche sostanza dalla stampa. Il PVA è comunque biocompatibile;
- studio della porosità e microstruttura degli scaffold, e test per definirne le proprietà meccaniche.

In conclusione risulta che la procedura completa potrebbe essere sfruttata per ricostruire strutture ossee differenti dalla mandibola che presentano una simmetria come, ad esempio, le vertebre o il cranio. Per strutture che non presentano simmetria rimane valida la parte di progettazione e realizzazione dello stampo.

Bibliografia

- [1] C. De Maria, A. De Acutis, and G. Vozzi, “Indirect Rapid Prototyping for Tissue Engineering.”
- [2] A. Cohen, A. Laviv, P. Berman, R. Nashef, and J. Abu-Tair, “Mandibular reconstruction using stereolithographic 3-dimensional printing modeling technology,” *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 108, no. 5, pp. 661–666, 2009.
- [3] L. H. Li, K. P. Kommareddy, C. Pilz, C. R. Zhou, P. Fratzl, and I. Manjubala, “In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2525–2531, Jul. 2010.
- [4] T. M. G. Chu, J. W. Halloran, S. J. Hollister, and S. E. Feinberg, “Hydroxyapatite implants with designed internal architecture,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 6, pp. 471–478, 2001.
- [5] E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, and J. T. Czernuszka, “Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1487–1497, Apr. 2003.
- [6] H. W. Sung, R. N. Huang, L. L. Huang, and C. C. Tsai, “In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 1, pp. 63–78, 1999.

APPENDICE: Codice delle funzioni implementate in C++

Lettura File STL e conversione in Itk mesh

```

MeshType::Pointer ConvertToMesh() {
    #ifndef vtkFloatingPointType
    #define vtkFloatingPointType float
    #endif
    MeshType::Pointer mesh = MeshType::New();
    const unsigned int numberOfPoints = polydata->GetNumberOfPoints();
    vtkPoints * vtkpoints = polydata->GetPoints();
    mesh->GetPoints()->Reserve( numberOfPoints );
    for(unsigned int p =0; p < numberOfPoints; p++){
        vtkFloatingPointType * apoint = vtkpoints->GetPoint( p );
        mesh->SetPoint( p, MeshType::PointType( apoint ) );}
    // Trasferisce le celle dal vtkPolyData al itk::Mesh
    vtkCellArray * triangleStrips = polydata->GetStrips();
    vtkIdType * cellPoints;
    vtkIdType numberOfCellPoints;
    // Prima conta il numero totale di triangoli da tutti i triangle Strips.
    unsigned int numberOfTriangles = 0;
    triangleStrips->InitTraversal();
    while( triangleStrips->GetNextCell( numberOfCellPoints, cellPoints)) {
        numberOfTriangles += numberOfCellPoints-2;}
    vtkCellArray * polygons = polydata->GetPolys();
    polygons->InitTraversal();
    while( polygons->GetNextCell( numberOfCellPoints, cellPoints)){
        if( numberOfCellPoints == 3 ){
            numberOfTriangles ++;}}
    // Riserva la memoria nell'itk::Mesh per tutti i triangoli
    mesh->GetCells()->Reserve( numberOfTriangles );
    // Copia i triangoli
    typedef MeshType::CellType CellType;
    typedef itk::TriangleCell< CellType > TriangleCellType;
    int cellId = 0;
    triangleStrips->InitTraversal();
    while( triangleStrips->GetNextCell( numberOfCellPoints, cellPoints ) ) {
        unsigned int numberOfTrianglesInStrip = numberOfCellPoints - 2;
        unsigned long pointIds[3];
        pointIds[0] = cellPoints[0];
        pointIds[1] = cellPoints[1];
        pointIds[2] = cellPoints[2];
        for( unsigned int t=0; t < numberOfTrianglesInStrip; t++ ){
            MeshType::CellAutoPointer c;
            TriangleCellType * tcell = new TriangleCellType;
            tcell->SetPointIds( pointIds );
            c.TakeOwnership( tcell );
            mesh->SetCell( cellId, c );
            cellId++;
            pointIds[0] = pointIds[1];
            pointIds[1] = pointIds[2];
            pointIds[2] = cellPoints[t+3];}}
    // Copia la normale ai triangoli
    polygons->InitTraversal();
    while( polygons->GetNextCell( numberOfCellPoints, cellPoints ) ){
        if( numberOfCellPoints !=3 ){
            continue;}
        MeshType::CellAutoPointer c;

```

```

        TriangleCellType * t = new TriangleCellType;
        t->SetPointIds( (unsigned long*)cellPoints );
        c.TakeOwnership( t );
        mesh->SetCell( cellId, c );
        cellId++;
    }
    std::cout << "Mesh " << std::endl;
    std::cout << "Number of Points = " << mesh->GetNumberOfPoints() <<
    std::endl;
    std::cout << "Number of Cells = " << mesh->GetNumberOfCells() <<
    std::endl;
    return mesh;}

```

Conversione in immagine binaria

```

typedef unsigned char OutputPixelType;
typedef itk::Image< OutputPixelType, 3 > OutputImageType;
public: OutputImageType::Pointer ConvertToBinary(double spac){
    MeshType::Pointer mesh = MeshType::New();
    mesh=ConvertToMesh();
    typedef itk::MeshSpatialObject<MeshType> MeshSpatialObjectType;
    MeshSpatialObjectType::Pointer myMeshSpatialObject =
    MeshSpatialObjectType::New();
    myMeshSpatialObject->SetMesh(mesh);
    myMeshSpatialObject->GetMesh();
    typedef itk::SpatialObjectWriter< 3, double, TriangleMeshTraits>
    WriterType;
    WriterType::Pointer writer = WriterType::New();
    writer->SetInput(myMeshSpatialObject);
    writer->SetFileName("mymesh" );
    writer->Update();
    int righe;
    std::string s;
    std::ifstream myfile ("mymesh", std::ios_base::in);
    FILE * pFile;
    pFile = fopen ("mymesh","r");
    int dim;
    dim=mesh->GetNumberOfPoints();
    int* v1;
    v1 = new int[dim];
    int* v2;
    v2 = new int[dim];
    int* v3;
    v3 = new int[dim];
    int* v4;
    v4 = new int[dim];
    bool a=true;
    while(a){
        for(int i=0;i<67;i++){
            char str[256];
            fscanf(pFile, "%s", &str);}
        for (int i=0; i<dim; i++){
            int n1;
            float n2;
            float n3;
            float n4;
            fscanf (pFile, "%i %f %f %f\n", &n1, &n2, &n3, &n4);
            v1[i]=n1;
            v2[i]=n2;

```

```

        v3[i]=n3;
        v4[i]= n4;}
    a=false;}
    int x_min;
    x_min=min(v2, dim);
    int x_max=max(v2, dim);
    int y_min=min(v3, dim);
    int y_max=max(v3, dim);
    int z_min=min(v4, dim);
    int z_max=max(v4, dim);
    int origine_x=x_min-5;
    int origine_y=y_min-5;
    int origine_z=z_min-5;
    int dim_x=(abs(x_max-x_min))+10;
    int dim_y=(abs(y_max-y_min))+10;
    int dim_z=(abs(z_max-z_min))+10;
    OutputImageType::Pointer binar=OutputImageType::New();
    //la dimensione sui vari assi va divisa per lo spacing sui vari assi
    OutputImageType::SizeType size;
    size[ 0 ] =ceil(dim_x/spac);
    size[ 1 ]=ceil(dim_y/spac);
    size[ 2 ] =ceil(dim_z/spac);
    X=ceil(dim_x/spac);
    Y=ceil(dim_y/spac);
    Z=ceil(dim_z/spac);
    OutputImageType::SpacingType spacing;
    spacing[0] =spac;
    spacing[1] =spac;
    spacing[2] =spac;
    OutputImageType::PointType origin;
    origin[0]= origine_x;
    origin[1]=origine_y;
    origin[2]= origine_z;
    //Setta il valore dei voxel Inside/Outside
    const OutputPixelType empty = 0;
    const OutputPixelType fill = 255;
    typedef itk::TriangleMeshToBinaryImageFilter<MeshType, OutputImageType>
    MeshFilterType;
    MeshFilterType::Pointer meshFilter = MeshFilterType::New();
    meshFilter->SetInput(mesh);
    meshFilter->SetSize (size);
    meshFilter->SetSpacing (spacing);
    meshFilter->SetOrigin(origin);
    meshFilter->SetInsideValue(fill);
    meshFilter->SetOutsideValue(empty);
    meshFilter->Update();
    binar=meshFilter->GetOutput();
    cout<< binar->GetLargestPossibleRegion();
    return binar;}

```

Specchio

```

itk::FixedArray<bool, 3> flipAxes;
flipAxes[0] = x; //true o false
flipAxes[1] = y; //true o false
flipAxes[2] = z; //true o false
typedef itk::FlipImageFilter <OutputImageType> FlipImageFilterType;
FlipImageFilterType::Pointer flipFilter = FlipImageFilterType::New ();
flipFilter->SetInput(immagine_da_specchiare);

```

```
flipFilter->SetFlipAxes(flipAxes);
binary_specchio=flipFilter->GetOutput();
```

Conversione da binaria a file stl

```
typedef itk::VTKImageExport< OutputImageType > ExportFilterType;
ExportFilterType::Pointer itkExporter = ExportFilterType::New();
itkExporter->SetInput(immagine_da_convertire);
vtkImageImport* vtkImporter = vtkImageImport::New();
ConnectPipelines(itkExporter, vtkImporter);
typedef itk::VTKImageImport< OutputImageType > ImportFilterType;
ImportFilterType::Pointer itkImporter = ImportFilterType::New();
vtkImageExport* vtkExporter = vtkImageExport::New();
ConnectPipelines(vtkExporter, itkImporter);
vtkImporter->Update();
vtkExporter->SetInputData( vtkImporter->GetOutput() );
typedef itk::ImageFileWriter< OutputImageType > WriterType2m;
WriterType2m::Pointer itkWriter = WriterType2m::New();
itkWriter->SetInput( itkImporter->GetOutput() );
vtkSmartPointer<vtkContourFilter> contour =
vtkSmartPointer<vtkContourFilter>::New();
contour->SetInputData( vtkImporter->GetOutput() );
contour->SetValue(0, 128);
contour->Update();
vtkPolyData * polydata = contour->GetOutput();
vtkPoints * vtkpoints = polydata->GetPoints();
vtkSTLWriter * stlwriter = vtkSTLWriter::New();
stlwriter->SetInputData(polydata);
stlwriter->SetFileName(nomefile);
stlwriter->Update();
```

Sottrazione

```
typedef unsigned char OutputPixelType;
typedef itk::Image< OutputPixelType, 3 > OutputImageType;
OutputImageType::Pointer difference(OutputImageType::Pointer binary1,
OutputImageType::Pointer binary2, int x3, int y3, int z3){
    OutputImageType::Pointer binary_dif = OutputImageType::New();
    OutputPixelType pixelvalue_dif ;
    OutputPixelType pixelvalue ;
    OutputPixelType pixelvalue3;
    OutputImageType::RegionType region_dif ;
    OutputImageType::IndexType start_dif ;
    start_dif [0] = 0;
    start_dif [1] = 0;
    start_dif [2] = 0;
    OutputImageType::IndexType pixelIndex3;
    OutputImageType::SizeType size_dif ;
    size_dif [0] =x3;
    size_dif [1] = y3;
    size_dif [2] =z3;
    region_dif .SetSize(size_dif );
    region_dif.SetIndex(start_dif );
    binary_dif ->SetRegions(region_dif );
    binary_dif ->Allocate();
    for (int x=0; x<x3; x++){
        for (int y=0; y<y3; y++){
            for (int z=0; z<z3; z++){
```

```

        pixelIndex3[0]=x;
        pixelIndex3[1]=y;
        pixelIndex3[2]=z;
        pixelvalue_dif=binary1->GetPixel(pixelIndex3);
        if (pixelvalue_dif==0){
            pixelvalue=binary2->GetPixel(pixelIndex3);
            if (pixelvalue==255){
                pixelvalue3=255;
                binary_dif->SetPixel(pixelIndex3, pixelvalue3);}
            else {pixelvalue3=0;
                binary_dif->SetPixel(pixelIndex3, pixelvalue3);}}
        else {pixelvalue3=0;
            binary_dif->SetPixel(pixelIndex3, pixelvalue3);}}}}
    return binary_dif;}

```

Creazione stampo versione 1.0: negativo dell'immagine

```

OutputImageType::Pointer binary_neg = OutputImageType::New();
OutputPixelType pixelvalue2;
OutputImageType::IndexType pixelIndex2;
OutputImageType::IndexType pixelIndex3;
OutputImageType::RegionType region_neg;
OutputImageType::IndexType start_neg;
start_neg[0] = 0;
start_neg[1] = 0;
start_neg[2] = 0;
OutputImageType::SizeType size_neg;
size_neg[0] =x1;
size_neg[1] = y1;
size_neg[2] =z1;
region_neg.SetSize(size_neg);
region_neg.SetIndex(start_neg);
binary_neg->SetRegions(region_neg);
binary_neg->Allocate();
const OutputPixelType empty = 0;
const OutputPixelType fill = 255;
for (int x=0; x<x1; x++){
    for (int y=0; y< y1; y++){
        for (int z=0; z<z1 z++){
            pixelIndex2[0]=x;
            pixelIndex2[1]=y;
            pixelIndex2[2]=z;
            pixelIndex3[0]=x;
            pixelIndex3[1]=y;
            pixelIndex3[2]=z;
            pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
            if (pixelvalue2==empty){
                binary_neg->SetPixel(pixelIndex3,fill);}
            else{
                binary_neg->SetPixel(pixelIndex3,empty);}
        }}}
}

```

Creazione dello stampo versione 2.0

```

int xm; //dimesioni immagine difetto
int ym;
int zm;
OutputPixelType pixelvalue1;
OutputImageType::IndexType pixelIndex1;
OutputPixelType pixelvalue2;
OutputImageType::IndexType pixelIndex2;
OutputImageType::IndexType pixelIndex3;
const OutputPixelType empty = 0;
const OutputPixelType fill = 255;
for (int x=6; x<xm-1; x++){
for (int y=0; y<ym; y++){
for(int z=0; z<zm; z++){
    pixelIndex1[0]=x;
    pixelIndex1[1]=y;
    pixelIndex1[2]=z;
    pixelIndex2[0]=x+1;
    pixelIndex2[1]=y;
    pixelIndex2[2]=z;
    pixelvalue1= binary->GetPixel(pixelIndex1);
    pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
    if (pixelvalue1==empty){
        if(pixelvalue2==fill){
            for (int c=0; c<7; c++){
                pixelIndex3[0]=x-c;
                pixelIndex3[1]=y;
                pixelIndex3[2]=z;
                binary->SetPixel(pixelIndex3,fill);
            }
        }
    }
}
}
for (int x=xm-6; x>0; x--){
for (int y=0; y<ym; y++){
for(int z=0; z<zm; z++){
    pixelIndex1[0]=x;
    pixelIndex1[1]=y;
    pixelIndex1[2]=z;
    pixelIndex2[0]=x-1;
    pixelIndex2[1]=y;
    pixelIndex2[2]=z;
    pixelvalue1= binary->GetPixel(pixelIndex1);
    pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
    if (pixelvalue1==empty){
        if(pixelvalue2==fill){
            for (int c=0; c<7; c++){
                pixelIndex3[0]=x+c;
                pixelIndex3[1]=y;
                pixelIndex3[2]=z;
                binary->SetPixel(pixelIndex3,fill);
            }
        }
    }
}
}
for (int x=0; x<xm; x++){
    for (int y=6; y<ym-1; y++){
        for(int z=0; z<zm; z++){
            pixelIndex1[0]=x;
            pixelIndex1[1]=y;
            pixelIndex1[2]=z;
            pixelIndex2[0]=x;
            pixelIndex2[1]=y+1;

```

```

        pixelIndex2[2]=z;
        pixelvalue1= binary->GetPixel(pixelIndex1);
        pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
        if (pixelvalue1==empty){
            if(pixelvalue2==fill){
                for (int c=0; c<7; c++){
                    pixelIndex3[0]=x;
                    pixelIndex3[1]=y-c;
                    pixelIndex3[2]=z;
                    binary->SetPixel(pixelIndex3,fill);
                }
            }
        }
    }
}
for (int x=0; x<xm; x++){
    for (int y=ym-6; y>0; y--){
        for(int z=0; z<zm; z++){
            pixelIndex1[0]=x;
            pixelIndex1[1]=y;
            pixelIndex1[2]=z;
            pixelIndex2[0]=x;
            pixelIndex2[1]=y-1;
            pixelIndex2[2]=z;
            pixelvalue1= binary->GetPixel(pixelIndex1);
            pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
            if (pixelvalue1==empty){
                if(pixelvalue2==fill){
                    for (int c=0; c<7; c++){
                        pixelIndex3[0]=x;
                        pixelIndex3[1]=y+c;
                        pixelIndex3[2]=z;
                        binary->SetPixel(pixelIndex3,fill);
                    }
                }
            }
        }
    }
}
for (int x=0; x<xm; x++){
    for (int y=0; y<ym; y++){
        for(int z=6; z<zm-1; z++){
            pixelIndex1[0]=x;
            pixelIndex1[1]=y;
            pixelIndex1[2]=z;
            pixelIndex2[0]=x;
            pixelIndex2[1]=y;
            pixelIndex2[2]=z+1;
            pixelvalue1= binary->GetPixel(pixelIndex1);
            pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
            if (pixelvalue1==empty){
                if(pixelvalue2==fill){
                    for (int c=0; c<7; c++){
                        pixelIndex3[0]=x;
                        pixelIndex3[1]=y;
                        pixelIndex3[2]=z-c;
                        binary->SetPixel(pixelIndex3,fill);
                    }
                }
            }
        }
    }
}
}
}
for (int x=0; x<xm; x++){
    for (int y=0; y<ym; y++){
        for(int z=zm-6; z>0; z--){
            pixelIndex1[0]=x;
            pixelIndex1[1]=y;
            pixelIndex1[2]=z;
            pixelIndex2[0]=x;

```



```
pixelIndex2[1]=y;
pixelIndex2[2]=z-1;
pixelvalue1= binary->GetPixel(pixelIndex1);
pixelvalue2= binary->GetPixel(pixelIndex2);
if (pixelvalue1==empty){
    if(pixelvalue2==fill){
        for (int c=0; c<7; c++){
            pixelIndex3[0]=x;
            pixelIndex3[1]=y;
            pixelIndex3[2]=z+c;
            binary->SetPixel(pixelIndex3,fill);
        }}
    }}
```